

MODELIZACIÓN DE CRECIMIENTOS MICROBIANOS EN MEDIOS HETEROGÉNEOS Y DE MOVILIDAD REDUCIDA

MICROBIAL GROWTH MODELLING IN HETEROGENEOUS MEDIA WITH REDUCED MOBILITY

Autores: **Meritxell Font¹**, **Marta Ginovart²**

¹Escola Superior d'Agricultura de Barcelona, Universitat Politècnica de Catalunya,
meritxellfmarques@gmail.com

²Departament de Matemàtiques, Universitat Politècnica de Catalunya,
marta.ginovart@upc.edu

Dirección postal: Edifici D4; C/Esteve Terradas, 8; Universitat Politècnica de Catalunya; 08860 Castelldefels (Barcelona); Spain

Resumen

En este trabajo se han analizado diversos modelos computacionales publicados en revistas científicas que abordan el estudio del crecimiento microbiano en entornos semisólidos y heterogéneos en superficie, para valorar el interés y utilidad que pueden tener estos modelos en el entorno académico. Se han escogido dos de los modelos analizados como referencias fundamentales y fuentes específicas de información para el diseño y parametrización de un modelo basado en el individuo que pueda ser manejado en el estudio de sistemas microbianos. El nuevo modelo desarrollado, llamado INDISIM-Plate-NL, permite tratar con el crecimiento no planctónico de la bacteria *Escherichiacoli* en una superficie, y se ha implementado en la plataforma de acceso libre NetLogo, un entorno de programación específico para la modelización multiagente. Con este nuevo simulador se han obtenido resultados de crecimiento bacteriano en forma de colonias con diferentes morfologías que están en buena correspondencia con resultados experimentales y resultados simulados publicados y referenciados en la literatura. El simulador posibilitará el estudio de estas poblaciones bacterianas con movilidad reducida a través de la realización de experimentos virtuales en el aula.

Palabras clave: Crecimiento bacteriano, crecimiento no planctónico, modelo basado en el individuo, NetLogo, simulación

Abstract

In this paper we have analysed various computer models published in scientific journals dealing with the study of microbial growth in semi-solid and heterogeneous environments on surface, to assess the interest and usefulness that these models could have in an academic context. We have chosen two of the analysed models as fundamental references and specific sources of information for the design and configuration of a new individual-based model that can be handled in the study of microbial systems. The new model developed, called INDISIM-Plate-NL, can deal with non-planktonic growth of the bacterium *Escherichia coli* on a surface, and it has been implemented in the free access NetLogo platform, a multi-agent programmable modelling environment. The outcomes of this new simulator related to bacterial growth in colonies with different morphologies are in good correspondence with experimental results and simulated results published and referenced in literature. The simulator will enable the study of these bacterial populations with reduced mobility through conducting virtual experiments in classroom.

Keywords: Bacterial growth, non-planktonic growth, individual-based model, NetLogo, simulation

Introducción

Los modelos diseñados para sistemas biológicos pueden ser muy simples si son muchas las suposiciones o hipótesis que los soportan, o más complicados y sofisticados si se quieren abordar cuestiones con más detalle o profundidad y son menos las hipótesis previas. Uno de los propósitos de desarrollar una representación idealizada y aproximada en la área de estudio de los sistemas vivos con soporte informático es conseguir un modelo de un sistema biológico, poder tener un sistema virtual para llevar a cabo simulaciones, conseguir resultados y/o salidas numéricas, representaciones gráficas temporales y espaciales de la evolución del sistema, y obtener respuestas a preguntas previamente formuladas en relación el sistema. Para todo eso, es necesario asumir tanto la apariencia como el comportamiento de los objetos que se encuentran intrarelacionados e interrelacionados configurando el sistema, y que se entiende o presupone que son significativos para su funcionamiento, para su evolución temporal-espacial. Por ejemplo, los modelos pueden relacionar o describir la abundancia, distribución, fluctuación y producción de organismos vivos en ambientes abióticos, según sean las condiciones de los recursos del entorno, y las relaciones de cooperación, competencia o simbiosis que se puedan establecer entre ellos. Hoy en día, los modelos biológicos pueden llegar a representar complejas redes tróficas, y se pueden utilizar para pronosticar o diagnosticar, para probar y ensayar distintos escenarios, y para contrastar hipótesis o aplicar teorías respecto a datos experimentales previamente obtenidos y analizados.

Gracias al aumento de la potencia de los ordenadores y de su capacidad para manipular grandes cantidades de datos, en los últimos años se están desarrollando diferentes tipos de modelización con una base computacional muy notable y significativa. La gran variedad de métodos de modelización existentes actualmente y de entornos de programación cada vez más sofisticados y avanzados, abren enormes posibilidades para poder tratar e investigar sistemas biológicos desde perspectivas bien diversas. Está bien asumido por la comunidad científica que según cuales sean la preguntas que queremos que el modelo pueda abordar, tendremos que escoger el tipo de modelización más conveniente. La decisión del tipo de modelo a utilizar para un sistema biológico depende principalmente de los objetivos del estudio, de las características propias del sistema a tratar y de la información de que se dispone sobre el sistema y los procesos implicados.

Modelos poblacionales y modelos basados en el individuo

Los modelos se pueden clasificar atendiendo al enfoque que se dé o la perspectiva que se tenga para representar el sistema, y según el nivel de observación con el que se describe el sistema, como modelos poblacionales o modelos basados en el individuo.

Los modelos poblacionales son modelos realizados directamente a nivel de población, con los que se obtienen resultados que tienen en cuenta el global de la población sin distinguir entre los diversos individuos que la configuran. Los modelos basados en el individuo (“*individual-based model*”, IBM), también conocidos como modelos basados en agentes (“*agent-based models*”), son modelos realizados a nivel de cada individuo que forma la población o cada parte discreta del sistema que se quiere estudiar. Estos modelos focalizan todo su interés en los distintos elementos que configuran el sistema, y los resultados a nivel poblacional se obtienen con la acumulación de los comportamientos de todos los individuos. También se pueden obtener resultados a nivel individual a partir de las distribuciones de las propiedades o características individuales que estos modelos controlan. Estos IBMs ofrecen atractivas oportunidades para el estudio de los sistemas biológicos (Wilensky & Rand, 2015; Ginovart, 2015, Railsback & Grimm, 2012; Ginovart et al., 2012).

La modelización más clásica fundamentada en funciones continuas y derivables como la formulación de ecuaciones diferenciales o los métodos de optimización para el ajuste de funciones son metodologías basadas en la perspectiva propia de los modelos poblacionales. Estas modelizaciones más tradicionales son las que de forma habitual se presentan y se estudian en ámbitos académicos de distintos niveles, y son las que se utilizan en el aula para para mostrar aplicaciones diversas de modelos en el ámbito biológico.

Algunos modelos matemáticos en ecología están basados en hipótesis o requisitos que pueden violar algunas de las características propias de la biología, y según cual sea el sistema a estudiar o las condiciones en las cuales este sistema se desarrolla, estas hipótesis o requisitos previos están muy lejos de poderse cumplir o verificar. Por ejemplo, combinando muchos organismos vivos y asumiendo que pueden ser descritos por una única variable, como el tamaño de la población, con la que se formulan ecuaciones diferenciales o integrales, o se forman sistemas de ecuaciones en los que participa esta variable, se vulnera el principio de que cada individuo es distinto, en comportamiento y fisiología, por lo que las ecuaciones resultan en una única combinación de genética e influencias del entorno. Es aceptado en biología que un

69 mismo individuo localizado en distintos medios pueda tener comportamientos
70 diferentes, crecer y reproducirse a velocidades, o de maneras, distintas según sean las
71 características del entorno local que lo rodea. Estos modelos poblacionales lo tienen
72 realmente difícil para poder distinguir entre individuos, comportamientos y
73 características locales, y poder considerar adaptaciones (o mutaciones) de estos
74 individuos a las características locales cambiantes en el tiempo que soportan. Por otro
75 lado, algunos de estos modelos poblacionales no distinguen entre localizaciones
76 individuales y asumen que cada individuo tiene un mismo efecto sobre cualquier otro
77 individuo de la población, cosa que, vulnera el principio biológico que las interacciones
78 son inherentemente locales, o bien que requieren de un tiempo específico para que se
79 produzcan en una escala espacial mayor (circunstancias que pueden ser determinantes
80 para la evolución de ciertos sistemas). Un individuo puede ser afectado o condicionado
81 predominantemente por otros individuos con los que puede establecer contacto.
82 También, para algunos de estos modelos poblacionales no es ni inmediato ni fácil
83 controlar de forma detallada o específica las entradas (y salidas) de individuos al (del)
84 sistema. No obstante, y pese a las limitaciones propias e inherentes de esta perspectiva
85 de modelización basada en la población, con la utilización de teorías y herramientas
86 matemáticas avanzadas se han realizado (y se están realizando) trabajos excepcionales y
87 estudios sorprendentes de sistemas biológicos diversos (Murray, 1990).

88 Hace aproximadamente 25 años que se consideró que había una motivación clara por el
89 uso de los IBMs en biología por su habilidad en simular variables intrapoblacionales o
90 interpoblacionales, ciclos de vida completos, adaptaciones del comportamiento del
91 individuo a condiciones internas o externas (medioambientales) cambiantes, a la vez
92 que por su capacidad para explorar vínculos o conexiones entre comportamientos
93 individuales con el comportamiento global observado en una población (Grimm, 1999;
94 Grimm & Raisback, 2005). Los primeros IBMs fueron formulados y utilizados para
95 estudiar la dinámica de los bosques y las comunidades de peces, pero actualmente sus
96 ámbitos de aplicación son muy diversos. Los IBMs son modelos que describen a los
97 individuos o partes que configuran un sistema como entidades autónomas y discretas, y
98 focalizan toda su atención en caracterizar estas entidades mediante reglas de
99 comportamiento, permitiendo que estas entidades interaccionen entre ellas y con el
100 entorno en el que se hallan. Son modelos computacionales que permiten tratar con
101 sistemas complejos. Los IBMs controlan las operaciones simultáneas de múltiples
102 entidades (son modelos discretos), en un entorno cambiante, en el que estas entidades

evolucionan y se desarrollan a lo largo del tiempo (son modelos dinámicos). Generalmente, se considera la aleatoriedad o el azar como un elemento importante a tener en cuenta (son modelos estocásticos). Pueden ser considerados modelos cualitativos, pero cada vez más, según como sea la parametrización y la calibración que se lleva a cabo, se convierten en modelos cuantitativos. Intentan entender cómo y de qué manera se producen los fenómenos observados (son modelos heurísticos). Son esencialmente modelos explicativos pero, con el progreso constante del uso de esta metodología, se están desarrollando actualmente modelos con capacidad predictiva. En estos IBMs se pueden considerar factores de variabilidad para introducir cierta aleatoriedad en el grupo de individuos, ya que, diferentes individuos de una misma masa, volumen o estado en el ciclo de reproducción se pueden desarrollar utilizando distintas vías o estrategias y pueden llegar a estados individuales diferentes, aunque tengan un origen común. Cada uno de estos individuos que configuran el sistema biológico tiene sus propias características (sexo, edad, masa, volumen, posición en el espacio, capacidad de movimiento, de respiración, de reproducción, entre otras) que van cambiando a medida que pasa el tiempo y según cuales sean las condiciones medioambientales con las que se encuentran. Las acciones o comportamientos que se modelizan para los individuos vivos están vinculados a la propia biología que los sustenta, como por ejemplo, al movimiento en el dominio que ocupan, al consumo de nutrientes, a la metabolización o uso de estos nutrientes para el mantenimiento y el incremento de masa, a la producción de productos como consecuencia de la transformación de nutrientes, a la reproducción, y a la viabilidad o muerte (Ginovart, 2015).

Sistemas microbianos

A la hora de investigar un sistema microbiano es fundamental tener en cuenta de qué tipo son las condiciones del medio en que se encuentra la población de microorganismos (individuos), ya que, las interacciones entre individuos y partículas de sustratos que conforman el sistema pueden ir variando de forma significativa a lo largo del tiempo y del espacio, y por lo tanto condicionar o modificar de manera substancial el propio comportamiento de estos microorganismos. Con sistemas microbianos en medio líquido, tanto los individuos (microorganismos) como los otros componentes del sistema (sustratos o productos) se encuentran distribuidos de manera uniforme, homogénea, por todo el espacio con patrones de difusión muy alta y constante, o bien

con patrones de redistribución continua (con movimiento pasivo). También los microorganismos podrían tener movimiento propio proporcionado por flagelos u otros dispositivos (movimiento activo) mientras flotan libremente en el líquido. Existen otros sistemas microbianos constituidos por poblaciones que se encuentran en un medio (o entorno) no líquido que condiciona de forma importante la movilidad de los individuos (los cuales pasan a tener una movilidad reducida) y que no presuponen la redistribución de nutriente en el espacio de forma homogénea a lo largo del tiempo. Por ejemplo, un sistema como este lo podríamos encontrar en un entorno no líquido que permitiera el crecimiento microbiano en superficie. En ese entorno los microorganismos deberían superar las fuerzas impuestas por la propia composición del medio para poder cambiar su ubicación física, para moverse o desplazarse. En este caso, es trascendental el proceso de difusión de nutrientes y productos que el medio permite para provocar cambios en la distribución de los elementos del sistema a lo largo del tiempo (incluidos los individuos), los cuales se pueden encontrar inicialmente distribuidos de forma heterogénea o discontinua en el espacio que ocupan. El hecho de poder alcanzar crecimientos exponenciales o logísticos, muy conocidos y utilizados en aplicaciones de tipo microbiológicas cuando se inoculan microorganismos en un medio líquido con nutrientes (crecimientos planctónicos), deja de ser probable o plausible cuando se inoculan microorganismos en un medio heterogéneo y de movilidad reducida (cuando se tienen crecimientos no planctónicos) como los que muestra la Figura 1.

Por ejemplo, en una placa o superficie con presencia de agar para reproducir características de un medio gelatinoso o semi-sólido, la evolución temporal-espacial de una población microbiana dependerá de las características de este medio, siendo entonces el crecimiento microbiano (no planctónico) que se observa en forma de colonia. Las colonias microbianas son conjuntos de microorganismos visibles macroscópicamente que se desarrollan a partir de un progenitor común o inóculo inicial (microorganismos que son introducidos accidental o voluntariamente en los medios de cultivos o entornos específicos) y que van avanzando de forma más o menos compacta durante la ocupación del espacio a lo largo del tiempo. Los microorganismos iniciales, unos pocos, se establecen en el medio y se van expandiendo, donde el crecimiento de la colonia es el resultado de la suma de los comportamientos individuales relativos a un movimiento reducido y dificultoso o a través de la reproducción con la aparición de nuevos individuos. En la Figura 2 se puede observar dos tipos de crecimiento bacteriano

no planctónico en superficie que corresponden a experimentos de laboratorio llevados a cabo en placa de agar.



Figura 1. Crecimiento en una placa de agar en el laboratorio de diversos tipos de microorganismos (bacterias, hongos, levaduras) que se encontraron en la superficie de la palma de una mano, con la aparición y formación de las correspondientes colonias, con formas, colores y brillos dependiendo de los tipos de microbios. Cortesía de Tasha Sturm/Cabrillo College/asm.org, y obtenida de http://experimentarconciencia.blogspot.com.es/2015/06/esos-bichos-llamados-microbios-y-como_18.html.

Los sistemas que forman biofilms, es decir, grupos de microorganismos en los que estos se encuentran pegados entre ellos y al mismo tiempo con una superficie sólida adyacente a un líquido, son otro tipo de crecimiento no planctónico. A partir de los microorganismos fijados a la matriz sólida, se forma una matriz de sustancia polimérica extracelular que permite al resto de microorganismos quedar enganchados con los otros de la base, dando al biofilm una estructura tridimensional más consistente rodeada por un medio líquido.



Figura 2. (A) Crecimiento de una colonia bacteria de *EscherichiaColi* en un medio con condiciones limitantes para su desarrollo. Cortesía de Peter Graik, <http://polymer.bu.edu/~trunfio/about.html>, y obtenida de <http://polymer.bu.edu/ogaf/html/chp51exp3.htm>. (B) Crecimiento de bacterias *Pseudomonasaeruginosa* en una placa de petri. Obtenida de https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Swarming_motility_of_Pseudomonas_aeruginosa.jpg.

En la naturaleza, una gran parte de las poblaciones de microorganismos experimentan un crecimiento no planctónico. Es decir, los sistemas microbianos se encuentran en medios no líquidos en los que ni los propios individuos ni otros posibles elementos que configuran el sistema (componentes orgánicos o inorgánicos) se encuentran distribuidos de manera homogénea, y donde para poder cambiarlas posiciones o localizaciones espaciales de los individuos y de los elementos se deben superar fuerzas impuestas por el propio medio que los rodea. Estos medios son principalmente medios gelatinosos con movilidad reducida, presentes en procesos de contaminación (o infección) de una superficie en contextos diversos como en el ámbito agroalimentario o biomédico, en los cuales la actividad microbiana está presente. A pesar del interés que puede tener el estudio de estos sistemas microbianos de crecimiento no planctónico, los modelos microbianos que mayoritariamente se conocen y se utilizan en el contexto académico son los modelos cinéticos de crecimiento planctónico. Han sido los más investigados y representados como consecuencia de su simplicidad en relación a las propiedades espaciales del medio que envuelve a los microorganismos. Además, los conocimientos o requerimientos de currículo que supone el manejo de estos modelos continuos clásicos se encuentran, generalmente, cubiertos por los contenidos de cálculo diferencial e

integral que se imparten en las asignaturas de matemáticas. Cuando las hipótesis previas de las propiedades del medio como medio homogéneo o la distribución aproximadamente uniforme de microorganismos en el espacio dejan de ser asumibles, las formulaciones de los modelos requieren de conceptos y herramientas de nivel matemático más avanzado, muchas veces fuera del alcance de ciertos entornos académicos.

Este trabajo se centra en el uso de modelos basados en el individuo (modelos computacionales) para estudiar crecimientos microbianos no planctónicos, es decir, crecimientos microbianos en entornos con movilidad reducida y medios heterogéneos, y evaluar su viabilidad para que puedan ser utilizados en el ámbito educativo (en el aula). La posibilidad de realizar experimentos virtuales con simuladores que entrenen al estudiante en la investigación y el análisis de estos sistemas microbianos favorecerá el conocimiento sobre estos crecimientos no planctónicos. Los objetivos específicos para este trabajo son:

- Identificar trabajos de modelización relevantes en el estudio de crecimiento microbiano no planctónico y elaborar tablas-resumen con sus características principales y más notables relacionadas con la modelización empleada, así como con su implementación en entornos de programación para la realización de las simulaciones.
- Elegir modelos de referencia a fin de que puedan ser utilizados como fuentes específicas de información que ayuden en el diseño de un nuevo IBM microbiano de crecimiento no planctónico en superficie.
- Escoger un entorno de programación adecuado para la implementación de este nuevo modelo y que pueda ser transportable con facilidad al ámbito académico.
- Diseñar e implementar el nuevo IBM que permita abordar el estudio de factores significativos del crecimiento bacteriano en una superficie con la formación de colonias, con el fin de poder disponer de un simulador para investigar en el aula la expansión de colonias bacterianas y sus diferentes morfologías, realizando experimentos virtuales y generando resultados de simulación diversos.

MODELOS MICROBIANOS BASADOS EN EL INDIVIDUO PARA CRECIMIENTOS EN MEDIOS NO PLANCTÓNICOS

El uso de los IBMs microbianos en diversos ámbitos de estudio se ha ido incrementando en los últimos años (Hellweger & Bucci, 2009). No fue hasta hace relativamente pocos

años que los avances en biología molecular y bioquímica provocaron el incremento de la aplicación de estos modelos a nivel de microorganismos. La plena integración de los IBMs en el marco de trabajo de la microbiología aplicada o microbiología predictiva, con modelos que intentan entender y predecir el comportamiento de los sistemas microbianos, aporta una conexión mesoscópica entre descripciones a nivel celular (microorganismo) y dinámicas observadas a nivel macroscópico de poblaciones microbianas. La modelización de sistemas microbianos desde la perspectiva de los IBMs consiste en simular sistemas formados por microorganismos (especies de bacterias y/o de levaduras, por ejemplo) en un medio ambiente (medio líquido, medio con movilidad reducida o medio semi-sólido), implementando las reglas de comportamiento de estos microorganismos, como por ejemplo movimiento, crecimiento, reproducción, viabilidad o muerte (y, posteriormente, lisis) en un código de computación. Ejecutando el programa creado, y dejando que el ordenador “recrea” el sistema virtual con microorganismos interaccionando entre ellos y con el medio que los rodea se consigue una representación de sistema real. El estado individual de cada uno de los microorganismos puede variar en función de su estado interno, de los diferentes recursos que se encuentran a su alcance, de la ocupación del dominio donde evolucionan, de las relaciones o competencias que se pueden establecer con otros microorganismos, etc. Los sistemas microbianos pueden ser considerados sistemas complejos, tanto por la complejidad que cada individuo (microorganismo) vivo tiene como por las posibles relaciones que se pueden establecer entre ellos, así como por las posibles relaciones con el entorno o el medio ambiente. Estos individuos (microorganismos) se desarrollan, viven, compiten por nutrientes, se mantienen viables o no, mueren y lisan, e incluso pueden inhibir a otros microorganismos o ellos mismos con la producción de productos finales o metabolitos secundarios. Su propia actividad metabólica hace que se modifiquen las condiciones de su entorno local, por lo que el control del espacio es importante, ya que en ciertos entornos de movilidad reducida estos microorganismos tienen dificultad para ir a explorar u ocupar otras nuevas posiciones espaciales.

La búsqueda bibliográfica que se realizó para conocer la situación actual o grado de desarrollo en que se encuentran los IBMs microbianos para estudiar crecimientos no planctónicos se centró en el crecimiento poblacional de colonias en superficie (espacio bidimensional), en entornos con movilidad reducida. No obstante, hay que señalar que también algunos artículos que modelizan e investigan biofilms contienen conceptos y

desarrollan ideas que permiten conectar de forma sugestiva con las características generales del crecimiento no planctónico que queremos estudiar. Se constató que la mayoría de los modelos microbianos se han ido desarrollado en medio líquido, ya que si el sistema microbiano se encuentra en medio no líquido las características y condiciones de los elementos que hay que representar se enmarcan en condiciones heterogéneas, entre partes o regiones del espacio considerado bien diferenciadas, lo que dificulta sensiblemente el desarrollo exitoso de los modelos.

De los casi 70 artículos que se revisaron se escogieron 10 publicaciones que pueden ser consideradas significantes en el estudio de crecimiento microbiano en medio no planctónico, y para estos trabajos se realizó un análisis detallado de la modelización que habían desarrollado. A partir de este análisis se han elaborado tablas-resumen con las características principales y más relevantes relacionadas con la modelización que presentan estos trabajos, así como de aspectos importantes relacionados con su implementación en entornos diversos de programación. Estos entornos de computación donde se ubican los modelos investigados (modelos computacionales) serán considerados como opciones posibles para poder llevar al ámbito educativo las simulaciones realizadas e investigar en el aula los sistemas microbianos que se estudian. Hay que decir que no siempre ha resultado ni inmediato ni fácil la identificación de la información requerida para confeccionar estas tablas-resumen a partir de la información dada en el trabajo publicado, evidenciando la dificultad intrínseca de comunicar de forma completa un modelo computacional.

Modelos seleccionados para un análisis detallado de sus características

El trabajo de Ben-Jacob, Cohen, & Gutnick (1998) que lleva por título “*Cooperative organization of bacterial colonies: From genotype to morphotype*” [B-J-1998] es el más antiguo de los 10 trabajos seleccionados para este análisis. Desarrolló un IBM a partir de una aproximación genérica combinando un estudio detallado del comportamiento y la dinámica de las células durante el desarrollo de las colonias con las relaciones que se establecen entre célula-célula. Partiendo de este modelo genérico, desarrolló dos IBMs más, uno que se centró en la formación de diferentes patrones a partir de la quimiotaxis generada por elementos atrayentes excretados por las células que se encuentran en lugares con una alta presencia de nutrientes; y otro que se centró en la formación de colonias en forma de vórtice con una quimiotaxis rotacional (la cual provoca que los

individuos formen patrones en los que se mueven de manera circular en el conjunto de la población).

Simuladores como los presentados en los trabajos de Kreft, Booth, & Wimpenny (1998) y de Ginovart, López, & Valls (2002a) fueron de los primeros simuladores que se diseñaron para modelizar y estudiar el crecimiento de bacterias bajo condiciones particulares desde la perspectiva de los IBMs. Se utilizaron para estudiar diversos procesos en los que se involucraba actividad microbiana y eran de interés para la biotecnología o la industria agroalimentaria (Ginovart et al., 2002b; Standaert et al., 2004; Dens et al., 2005a y 2005b; Prats et al., 2010).

En el trabajo “*Individual-based modelling of biofilms*” [K-2001], Kreft et al. (2001) desarrolló la segunda versión del modelo base que se había generado previamente (Kreft, Booth&Wimpenny, 1998) para la simulación del crecimiento de colonias multiespecies, en un multi-sustrato, con diversas especies nitrificantes que conformaban biofilms bidimensionales con concentraciones de sustrato muy heterogéneas. Las posibilidades que tenían los individuos de fijarse inicialmente en un lugar u otro del sólido podía modificar tanto la forma del biofilm que se desarrollaba y se conseguía, como el crecimiento de los propios microorganismos, en respuesta a las notables variaciones de sustrato que encontraban en el medio que ocupaban. Aunque nuestro interés se centra en colonias microbianas y no en biofilms, este modelo es interesante por el tratamiento que da a la heterogeneidad del medio en el que evoluciona o desarrolla la población de microorganismos.

Ginovart et al. (2002c), en el trabajo “*Individual based simulations of bacterial growth on agar plates*” [G-2002], presentó una adaptación del modelo bacteriano general y básico, que se había generado previamente para el estudio del crecimiento bacteriano en medio líquido (Ginovart, López, & Valls, 2002a). Desarrolló un IBM que estudiaba el comportamiento del crecimiento de colonias bacterianas en una placa de agar con diferentes condiciones iniciales de concentración de nutriente, peptona, y donde la cantidad de agar que se utilizaba se encontraba relacionada con la difusión de los nutrientes en la superficie.

Emonet et al. (2005), en el trabajo “*AgentCell: a digital single-cell assay for bacterial chemotaxis*” [E-2005], desarrolló un modelo para estudiar la relación entre los procesos intracelulares aleatorios y la variabilidad del comportamiento de las células individuales, teniendo en cuenta muchos de los mecanismos intracelulares responsables

de la quimiotaxis, como son por ejemplo la señalización de los caminos que siguen los microorganismos o la representación explícita de los flagelos y motores.

Por otra parte, Bray, Levin, & Lipkow (2007), en el trabajo "*The chemotactic behavior of computer-based surrogate bacteria*" [B-2007], desarrolló un modelo que simulaba las respuestas de 60 mutantes de una bacteria en gradientes atrayentes de nutrientes (quimiotaxis) basándose en datos recopilados de su movimiento, dando el mismo fenotipo a los 60 mutantes pero eliminando o sobreexpresando los componentes de los caminos de la quimiotaxis para reproducir las respuestas de éstos respecto el nutriente que los atrae.

Grijspeerdt, Kreft, & Messens (2005), en el trabajo "*Individual-based modeling of growth and migration of Salmonella enteritidis in hens' eggs*" [G-2005], utilizó un IBM para estudiar el fenómeno que se produce cuando un huevo se contamina con *Salmonella*. Para sobrevivir, los microorganismos de *Salmonella* debían penetrar la cáscara y la membrana del huevo, migrar a través de la clara, la cual les resultaba desfavorable para su crecimiento, y penetrar otra membrana para llegar hasta la yema, donde las condiciones eran favorables para su crecimiento.

Olivera-Nappa, Picioreanu, & Asenjo (2010) propuso en el trabajo "*Non-homogeneous biofilm modeling applied to bioleaching processes*" [O-N-2010] un primer modelo de biofilm bidimensional no homogéneo con el fin de estudiar las reacciones químicas y bioquímicas a escala de microorganismos. Se centraba en la relación espacial y temporal entre estas reacciones, el crecimiento de los microorganismos y los cambios morfológicos de un biofilm causados por la formación de un producto sólido residual que limitaba la difusión dentro del biofilm. A pesar de tratarse de un biofilm, es un modelo destacable por el tratamiento que hace de la heterogeneidad del medio y por su atención en la relación de los microorganismos y de los productos residuales generados que se encuentran en el propio biofilm.

Mabrouk et al. (2010) presentó en el trabajo "*Bacteria can form interconnected microcolonies when a self-excreted product reduces their surface motility: evidence from individual-based model simulations*" [M-2010] un IBM basado en observaciones experimentales que revelaron que bajo unas condiciones de crecimiento específicas las bacterias formaban patrones de microcolonias interconectadas. Estudió el rol de la movilidad de las bacterias y la producción de sustancias extracelulares en la formación de estos patrones, y a pesar de ser un modelo basado en biofilms, es un trabajo muy interesante porque tiene en cuenta un medio con movilidad reducida y el crecimiento de

diversas colonias bacterianas en superficies (espacios bidimensionales). Después, Mabrouk & Deffuant (2011) propuso en el trabajo “*A simple birth-death-migration individual-based model for biofilm development*” [M-2011] otro modelo de biofilm en el que también se producía un crecimiento en forma de colonia pero en el que se centraba sólo en tres factores que consideró que eran los más significantes: el nacimiento, la muerte y la movilidad de los microorganismos según el tipo de superficie. Intentó conseguir un diseño de modelo minimalista que fuera capaz de reproducir una gran diversidad de patrones de crecimiento para una colonia.

El último trabajo analizado es muy reciente, Tack et al. (2014) en “*An individual-based modeling approach to simulate the effects of cellular nutrient competition on Escherichia coli K-12 MG1655 colony behavior and interactions in aerobic structured food systems*” [T-2014] utilizó un modelo previamente desarrollado por Verhulst et al. (2011) y que en su versión más básica se generó a partir de las ideas del modelo de Kreft, Booth, & Wimpenny (1998). Tack et al. (2014) desarrolló una extensión de este modelo de Verhulst para poder reproducir el comportamiento y las interacciones de colonias bacterianas monocapas en un superficie cuando se hallan sujetas a limitaciones de nutriente debidas a la difusión que se tiene en un medio gelatinoso (inicialmente homogéneo y con condiciones aeróbicas). Utilizó para la parametrización del modelo datos de parámetros celulares disponibles en trabajos anteriores así como algunas observaciones experimentales de crecimiento bacteriano en medio con gel. Describió la dinámica de la colonia bacteriana bajo condiciones específicas de nutriente en el medio, a partir de la evolución temporal de su radio, de su morfología, y de la emergencia dentro la colonia de una zona de inanición (zona con baja concentración de nutrientes).

La Tabla 1 recoge, para cada uno de los 10 trabajos analizados y comentados anteriormente, las propiedades del dimensionado, es decir, nos dice si es un modelo elaborado en dos dimensiones (2D) o en tres dimensiones (3D), y el escalado, haciendo referencia a si los modelos son discretos en el tiempo y/o en el espacio, es decir, si dividen el tiempo y el espacio en unidades o si consideran estas variables continuas. También se incluye si se procesa la información microbiana a partir del número de microorganismos o de la cantidad de biomasa total, indicando cuales son los máximos que pueden llegar a controlar y simular.

Tabla 1. Dimensionado y escalado. 1: Si, 0: No. Las referencias se encuentran detalladas en el texto.

Referencia	Dimensionado		Discreto		Control de la población		
	2D	3D	Tiempo	Espacio	Biomasa total	Recuento individual	Valor máximo
B-J-1998	0	1	1	1	0	1	$10^2 - 10^4$ cfu
K-2001	1	1	1	0	1	0	290 g/L
G-2002	1	0	1	1	0	1	$5 \times 10^3 - 10^4$ cfu
E-2005	0	1	1	1	0	1	1166 cfu
G-2005	0	1	1	1	0	1	10^5 cfu/ml
B-2007	1	0	1	1	0	1	1000 cfu
M-2010	1	0	1	1	1	0	290×10^{-6} kg bio/m ²
O-N-2010	1	0	0	1	1	0	3×10^5 g/m ³
M-2011	1	0	1	1	0	1	-
T-2014	1	0	1	1	0	1	10^9 cfu/ml

La Tabla 2 recoge algunas de las propiedades individuales de las pequeñas parcelas en que se ha dividido el espacio (el reticulado del dominio), así como las propiedades o características que pueden controlar sobre cada una de las unidades de espacio que configuran el ambiente, como su tamaño expresado en unidades reales, la consideración o no de nutrientes en el espacio, la humedad o la temperatura.

Tabla 2. Propiedades individuales de la unidad de espacio en que se ha discretizado el dominio. 1: Si, 0: No. Las referencias se encuentran detalladas en el texto.

Referencia	Tamaño	Nutrientes	Humedad	Temperatura
B-J-1998	-	1	0	0
K-2001	-	1	1	1
G-2002	1	1	0	1
E-2005	-	1	0	1
G-2005	-	1	0	1
B-2007	-	1	0	0
M-2010	$5 \times 5 \mu\text{m}^2$	0	0	0
O-N-2010	-	0	0	0
M-2011	-	1	0	0
T-2014	$2 \times 2 \mu\text{m}^2$	1	0	0

La Tabla 3 recoge la información sobre las unidades reales y las unidades de simulación de las escalas espaciales y las escalas temporales utilizadas en los diferentes trabajos. También indica la equivalencia o correspondencia que se considera para un paso de programa (paso de tiempo) en la simulación.

Tabla 3. Escalas temporales y espaciales. 1: Si, 0: No. Las referencias se encuentran detalladas en el texto.

Referencia	Unidades reales		Unidades de simulación		
	Tiempo	Espacio	Tiempo	Espacio	Paso de

	máximo	máximo	máximo	máximo	tiempo
B-J-1998	-	-	-	-	-
K-2001	70 días	200x2x200 μm^3	-	100x1x100	1 min
G-2002	-	-	250000	350x350	-
E-2005	40 min	-	50000	-	0.01 s
G-2005	78.3 h	5.65x4.15x4.15	-	-	0.1 s
B-2007	1200 s	900 μm de radio	-	-	1 min
M-2010	24 h	2000x2000 μm	-	400x400	0.02 s
O-N-2010	6 días	66 x 66 μm	-	-	1 s
M-2011	-	-	-	101x101	5-30 min
T-2014	70 h	1 mm^2	-	-	-
					0.0005 min
					0.1 min

La Tabla 4 recopila los tipos de microorganismos con los que se trabaja o sirven de referencia para cada modelo desarrollado, y si se utilizan o no algunas de sus propiedades individuales, como por ejemplo, su masa, volumen o tamaño. También se ha recogido, si es que se indica en el trabajo publicado, si se considera o no su capacidad individual de almacenar energía y/o de crecer aumentando la masa o el volumen individual.

Tabla 4. Tipo de microorganismos y propiedades individuales de estos. 1: Si, 0: No. Las referencias se encuentran detalladas en el texto.

Referencia	Microorganismos	Propiedades individuales				
		Masa	Área / Volumen	Medidas	Energía	Crecimiento celular
B-J-1998	<i>Escherichia coli</i> / <i>Salmonella typhimurium</i>	0	0	-	1	0
K-2001	<i>Escherichia coli</i>	1	1	/ > 0.2 fl	1	1
G-2002	<i>Bacillus subtilis</i>	1	1	-	0	1
E-2005	<i>Escherichia coli</i>	0	1	/ > 1.41 fl	0	0
G-2005	<i>Salmonella enteritidis</i>	0	1	/ > 0.4 fl	0	1
B-2007	<i>Escherichia coli</i> , genotips mutants	0	0	-	0	0
M-2010	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	0	> 10^{-15} kg / ~ 3.14 μm^2	0	1
O-N-2010	<i>Acidithio bacillus ferrooxidans</i>	1	1	> 5×10^{-14} g / 1.7 μm^2	0	1
M-2011	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	-	0	0
T-2014	<i>Escherichia coli</i> K-12 MG1655	1	1	4 μm^2	0	1

La Tabla 5 recoge los diversos procesos o acciones que pueden realizar los microorganismos en cada modelo, como son por ejemplo, el consumo de nutrientes, la excreción de sustancias o productos residuales, el mantenimiento celular a partir de una energía almacenada, la creación de nueva masa, la reproducción y la pérdida de viabilidad y/o muerte.

Tabla 1. Procesos que realizan los microorganismos. 1: Si, 0: No. Las referencias se encuentran detalladas en el texto.

Referencia	Consumo	Excreción	Mantenimiento	Reproducción	Pérdida de viabilidad o muerte
B-J-1998	1	1	1	1	1
K-2001	1	1	1	1	1
G-2002	1	0	1	1	0
E-2005	0	0	0	0	0
G-2005	0	0	0	1	0
B-2007	0	0	0	0	0
M-2010	1	1	1	1	0
O-N-2010	1	0	0	1	0
M-2011	0	0	0	1	1
T-2014	1	0	1	1	0

En la Tabla 6 se recogen todos los procesos de transporte que se consideran explícitamente referenciados en los modelos publicados, como por ejemplo la difusión de los microorganismos o el transporte de sustancias o productos (elementos) por difusión, el movimiento aleatorio o no aleatorio de microorganismos, la ocupación del espacio o superficie por parte del microorganismos por reproducción y/o movimiento provocado por una posible quimiotaxis (movimiento activo de los individuos a través de gradientes químicos como por ejemplo los nutrientes o algún producto tóxico).

Tabla 2. Procesos de transporte. 1: Si, 0: No. Las referencias se encuentran detalladas en el texto.

Referencia	Difusión		Movimiento		Ocupación de espacio		Quimiotaxis
	Elementos	Individuos	Aleatorio	No aleatorio	Movimiento	Reproducción	
B-J-1998	1	0	1	0	1	1	1
K-2001	1	0	1	0	0	1	0
G-2002	1	0	1	0	0	1	0
E-2005	0	0	1	1	1	0	1
G-2005	0	0	1	1	1	1	1
B-2007	1	0	1	1	1	0	1
M-2010	0	1	1	0	1	1	0
O-N-2010	1	1	0	0	0	1	0
M-2011	0	0	1	0	1	1	0
T-2014	1	0	1	0	0	1	0

En la Tabla 7 se encuentran recogidos los lenguajes de programación utilizados en los códigos con los que se han implementado los modelos diseñados y las plataformas sobre las que se ha llevado a cabo la implementación del programa y se han ejecutado las simulaciones. Por tratarse de modelos computacionales, es fundamental conocer esta parte del proceso si se quiere hacer uso, después, del modelo en el ámbito académico. No tener el modelo computacional operativo, tangible, y listo para ser ejecutado, es no

tener nada con lo que poder investigar el sistema microbiano. Disponer únicamente de una formulación teórica del modelo es valioso desde la perspectiva de la construcción de conocimiento y la interrelación o conexión de conceptos, pero sin la implementación en un entorno de programación, sin un simulador que se pueda manejar, la aproximación al sistema de estudio deja de ser válida en el ámbito educativo. Es necesario poder realizar simulaciones en el aula, y por tanto tener un simulador con valores de entrada y salidas gráficas y numéricas. También se han identificado si los propósitos de los modelos y los objetivos bajo los que se ha desarrollado el trabajo perseguían resultados de tipo fundamentalmente cualitativo o se dirigían a conseguir resultados de tipo cuantitativo. Los nombres o acrónimos que se pusieron a cada uno de los modelos analizados, con el fin de poder reconocer futuras versiones o extensiones, también se han recogido en la Tabla 7.

Tabla 7. Plataforma, lenguaje de programación, objetivo o propósito del modelo y nombre del modelo. 1: Si, 0: No. Las referencias se encuentran detalladas en el texto.

Referencia	Plataforma / Lenguaje de Programación	Objetivo		Modelo
		Cualitativo	Cuantitativo	
B-J-1998	-	1	1	The Communicating Walkers (extensión)
K-2001	Gecko / Objective-C	0	1	BacSim (extensión)
G-2002	- / Fortran	1	0	INDISIM (extensión)
E-2005	Repast / Java	1	1	AgentCell
G-2005	- / Java	1	0	BacSim (extensión)
B-2007	BacterialChemoTaxis / -	1	1	<i>E. solo</i> / <i>E. pluribus</i>
M-2010	Mason / Java	1	0	-
O-N-2010	- / C++	0	1	-
M-2011	Mason / Java	1	0	-
T-2014	Repast Symphony software / Java within Eclipse IDE	1	1	MICRODIMS (extensión)

Con los trabajos publicados que se han supervisado y consultado, se ha constatado que en los últimos años se han conseguido desarrollar modelos computacionales muy avanzados e innovadores que pueden tener en cuenta gran cantidad de características (variables) diferentes para los microorganismos implicados, así como el medio donde éstos se encuentran, consiguiendo llegar a un nivel de elaboración y profundidad muy considerable, el cual hasta hace unos años era impensable. Por ejemplo, los trabajos de Lardon et al. (2011), “*iDynoMiCS: next generation individual-based modelling of biofilms*”, y de Biggs & Papin (2013), “*Novel multiscale modeling tool applied to Pseudomonas aeruginosa biofilm formation*”, a pesar de presentar modelos que muy probablemente se escaparían de lo que podrían ser modelos alcanzables y plausibles

para desarrollar y utilizar en el ámbito docente (a nivel universitario), son trabajos que merecen ser referenciados en este contexto por sus grandes logros. Son excelentes ejemplos de los avances que se están haciendo en este contexto de modelización de crecimientos microbianos no planctónicos y nos permiten percibir las extraordinarias expectativas que están generando los modelos computacionales hoy en día.

Valoración de los modelos analizados para poder ser utilizados en el entorno educativo

Durante esta revisión bibliográfica y la confección de las Tablas 1-7 se ha podido comprobar que los artículos publicados no siempre son comprensibles o suficientemente completos a la hora de explicar con qué y cómo se ha elaborado el modelo (y el correspondiente simulador), o qué factores se han tenido en cuenta y cuáles se han obviado, y las razones de ello. Conocer los detalles de los modelos para poderlos reproducir o replicar y verificar los resultados de simulación publicados (procedimiento necesario en el ámbito científico) es casi una tarea imposible. Son múltiples los agujeros o lagunas que se detectan en la presentación y descripción de estos modelos computacionales. Debido a la falta de información explícita, concisa y clara en algunos momentos se hace necesario asumir ciertas hipótesis o hacer algunas suposiciones en relación a la construcción del modelo (y/o simulador). Incluso, se ha llegado a descartar la inclusión de algunos artículos publicados en la revisión detallada que se llevó a cabo (Tablas 1-7), ya que, la falta de descripción de algunos elementos involucrados en el modelo llevaba a la confusión e incertidumbre sobre conceptos y procesos considerados. La no disponibilidad de los códigos de computación utilizados para obtener los resultados de simulación que se presentan en las publicaciones, o bien la necesidad de tener ciertos programas que no son libres o accesibles fácilmente en un entorno académico para ejecutar el simulador, hace que sea imposible entender en su totalidad el modelo computacional elaborado. El hecho de no poder disponer del código de computación, o del simulador que ha resultado de la implementación del modelo, es una limitación importante para poder abordar el estudio de estos sistemas en el entorno académico. En otros casos, cuando la publicación no ofrece el código de computación directamente, pero sí la herramienta que los autores han diseñado y desarrollado, el uso de ésta puede requerir de un manual o guía de usuario para la instalación del programa, siendo no inmediato su funcionamiento. Este tipo de situación hace que si no hay un interés muy específico y concreto en su contenido, se desestime el trabajo y se busque

algun otro trabajo que permita una entrada más suave en el código de computación y el programa, fácil de abordar y ágil en su uso. Para favorecer el uso de estos modelos en el ámbito académico estos requisitos de facilidad y agilidad de uso son incuestionables. En cuanto a la descripción de los IBMs, en los últimos años se está utilizando el protocolo ODD (Overview, Design and Details) para englobar las diferentes partes que configuran la presentación y explicación de un IBM, independientemente de la plataforma y lenguaje de programación que se utilice (Ginovart, 2015). Es un protocolo aceptado por la comunidad científica que facilita el proceso de esquematizar y ordenar la descripción de un modelo y facilita la comparación de descripciones de varios modelos de forma más objetiva. Grimm y un grupo importante de modelizadores lo propusieron en el año 2006 como respuesta a las dificultades que había en ese momento para la descripción y revisión de los IBM, siendo más tarde actualizado el protocolo original (Grimm et al., 2006 y 2010). Algunos de los artículos citados en esta revisión han sido descritos siguiendo este protocolo, como es el caso de Mabrouk et al. (2010), Lardon et al. (2011), Mabrouk & Deffuant (2011) y Tack et al. (2014). El resto de trabajos datan de años anteriores a la consolidación de este protocolo, por lo que utilizaron una estructura libre y subjetiva para la descripción de los modelos. Un intento de solucionar la falta de universalización en el modo de enviar la información y la no disponibilidad de códigos de computación en artículos científicos publicados que trabajan con modelos computacionales fue la creación de una biblioteca virtual en 2014. Rollins et al. (2014), en el trabajo “*A computational model library for publishing model documentation and code*”, explica que se ha creado el depósito de acceso abierto *Network for Computational Modeling in Social and Ecological Sciences* (CoMSES Net) *Computational Model Library*, en el cual los investigadores pueden publicar el código y la documentación de sus modelos computacionales. CoMSES Net es una comunidad científica destinada a compartir el conocimiento y establecer estándares para la investigación en la modelización computacional, y se podría pensar que llegará el momento en que esta idea también podría funcionar en el ámbito docente. En el ámbito académico es imprescindible que estos modelos computacionales se puedan replicar, y que se puedan verificar resultados de simulaciones, para poder después, generar nuevas simulaciones y avanzar en la comprensión de los sistemas que se están estudiando. La no disponibilidad de códigos de computación, así como la gran dificultad de crear los propios códigos de computación a partir de las descripciones o explicaciones que aparecen en los trabajos publicados, hace evidente que si se quiere

avanzar en el uso de IBMs en el entorno educativo, hay que tener un entorno de programación adecuado y modelos-ejemplo de referencia adaptables a los niveles donde su uso puede ser desplegado.

MATERIAL Y MÉTODOS EN EL DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN DE UN NUEVO IBM PARA ESTUDIAR CRECIMIENTOS MICROBIANOS EN MEDIOS HETEROGÉNEOS Y DE MOVILIDAD REDUCIDA

La extensión de INDISIM (INDividual DIScret SIMulation) desarrollada en el trabajo de Ginovart et al. (2002c) se ha tomado como referencia base o punto de salida en el desarrollo del nuevo IBM para tratar con el crecimiento bacteriano no planctónico (en un medio heterogéneo de movilidad reducida). INDISIM hace referencia a una metodología de modelización discreta y también a un programa que inicialmente se desarrolló en lenguaje Fortran y que permite obtener diferentes variables de salida, a través de simulaciones, para estudiar comunidades bacterianas y su ambiente. Fue uno de los primeros trabajos de IBM microbianos, a pesar de que esta terminología en esos años no estaba admitida ni extendida, y por ello fue novedoso en su momento. No obstante, el entorno de programación y el manejo y análisis de simulaciones era muy limitado y complicado debido a la carencia de salidas gráficas y al manejo estadístico de los resultados que se debía gestionar. Actualmente, y de forma muy evidente, en el entorno educativo no tiene sentido trabajar con simuladores que no faciliten la obtención de salidas gráficas, que no sean fáciles de verificar o modificar, y que no permitan un diseño ágil de diferentes escenarios para el análisis y discusión del modelo, así como la recuperación de datos resultantes para su posterior análisis estadístico. Desde principios del siglo XXI, los avances en entornos de programación que han sido ideados especialmente para trabajar con sistemas complejos adaptativos e IBMs han sido espectaculares. Por lo que no tiene sentido no aprovechar todas estas nuevas opciones y facilidades que las nuevas plataformas de programación ofrecen para poder implementar modelos computacionales (Ginovart 2015).

El otro trabajo de referencia directa como fuente de información principal para la parametrización del nuevo IBM de crecimiento bacteriano no planctónico es el reciente trabajo de Tack et al. (2014). Las referencias y resultados experimentales que utilizó este trabajo se encuentran en buena correspondencia con los requerimientos que una parametrización de un IBM bacteriano necesitaría. Es muy ventajoso poder utilizar

información sobre experimentación expresamente llevada a cabo para sintonizar con los parámetros de entrada o variables que requiere el IBM.

Los simuladores desarrollados por Ginovart et al. (2002c) y Tack et al. (2014) no están disponibles ni son accesibles para un entorno educativo. Por una parte, actualmente no es aconsejable la implementación en Fortran de simuladores que quieran tener una divulgación atractiva en el entorno educativo, como podría ser el caso del trabajo de Ginovart et al. (2002c). Y por otra parte, el simulador de Tack et al. (2014) que no ofrece ni da acceso al código del programa en su publicación, se implementó en un entorno de programación que requiere de un conocimiento avanzado de programación, resultando, por tanto, un entorno de trabajo propicio para realizar investigación avanzada pero muy poco adecuado para llevarlo al aula, por lo que no sería ni plausible ni recomendable utilizarlo en el entorno educativo.

La descripción que se hace del IBM microbiano desarrollado en este trabajo se ajusta al protocolo ODD, para conseguir una explicación completa y comprensible, facilitando así su posible replicación, ayudando a que los fundamentos teóricos de su formulación sean visibles (Grimm et al., 2006 y 2010). La idea básica del protocolo es estructurar la información de un IBM en una determinada secuencia, la cual consiste en siete elementos agrupados en tres bloques principales: i) *Overview* con el Propósito, las Variables de estado y escalas, y la Perspectiva del proceso y programación, ii) *Design concepts* con conceptos generales identificados en el campo de los sistemas adaptativos complejos, y iii) *Details* con la Inicialización, las Entradas y los Sub-modelos.

Para la implementación del IBM microbiano diseñado se ha elegido la plataforma que se ha considerado más adecuada para un entorno educativo, la plataforma NetLogo, del *Northwestern University's Center for Connected Learning and Computer-Based Modeling* (Wilensky, 1999). Es un entorno de programación que permite la implementación de IBMs y la simulación del comportamiento de sistemas complejos a lo largo del tiempo y del espacio. NetLogo se diseñó con perspectiva educativa (Ginovart, 2015), incorporando una colección de modelos computacionales preparados para ser utilizados directamente por el usuario (verificados previamente por los gestores de la plataforma) y que también pueden ser modificados por un usuario avanzado (*Models Library*), a la vez que es un entorno de edición que permite a estudiantes, profesores y especialistas curriculares crear sus propios modelos. También existe *NetLogo User Community Models* que constituye el conjunto de modelos aportados por la comunidad de usuarios de NetLogo para compartir con otros usuarios. Este hecho lo

hace especialmente atractivo, ya que, un modelo creado y verificado podrá ser compartido con otros usuarios de la plataforma facilitando una rápida y eficiente divulgación dentro de la comunidad educativa. La plataforma fue diseñada para tratar con agentes o individuos móviles actuando a la vez en el espacio y en el tiempo, con un comportamiento que puede ser controlado o modificado por las interacciones locales. Los programadores, en este contexto, pueden dar instrucciones a cientos o miles de individuos para que operen de manera independiente entre sí y con el entorno en el que se encuentran inmersos. Esto hace posible explorar la relación entre el comportamiento de los agentes (visualización del sistema a bajo nivel) y de los patrones macroscópicos del sistema (visualización a alto nivel) que surgen o emergen a partir de la acción-interacción de muchos agentes que se encuentran en un entorno cambiante (las acciones individuales modifican dicho entorno). El lenguaje de programación de NetLogo diseñado con el espíritu del lenguaje Logo es más sencillo que otros lenguaje utilizados para este tipo de programación (como pueden ser por ejemplo el C++, Objective-C o Java) permitiendo una animación automática ligada al modelo y a los controles gráficos opcionales. Los dos elementos o agentes principales que utiliza NetLogo son *turtles* y *patches* (Wilensky & Rand, 2015). Los primeros son los individuos que tienen capacidad de movimiento en el “mundo” (espacio en donde estos se desarrollan y evolucionan), interaccionan entre sí y con el medio, y están registrados por un identificador que es único para cada *turtle*. Los segundos son las unidades básicas del espacio XY que no tienen movimiento, son cada una de las porciones cuadradas, celdas, en que se subdivide el “mundo”, identificando cada *patch* por las coordenadas cartesianas de su punto central. La estructura del entorno de programación de NetLogo se adapta muy bien para el estudio de sistemas microbianos en entornos bidimensionales y heterogéneos.

DESCRIPCIÓN DEL NUEVO IBM PARA EL ESTUDIO DE CRECIMIENTOS BACTERIANOS EN MEDIO NO PLANCTÓNICO

La descripción del nuevo IBM diseñado que se llamará INDISIM-Plate-NL (INDividual DIScret SIMulation - Plate - NetLogo) se efectúa de acuerdo con el protocolo ODD propuesto por Grimm et al. (2010).

Overview

Propósito

El propósito del modelo INDISIM-Plate-NL es investigar de manera cuantitativa y cualitativa el comportamiento de colonias bacterianas en medio no planctónico. Para unas pocas bacterias iniciales en una superficie (inóculos) que generaran la formación de colonias bacterianas, el crecimiento en un entorno no líquido difiere de forma importante del crecimiento planctónico debido a las restricciones físicas en el movimiento de las bacterias y a las limitaciones en la difusión de sustancias (nutrientes y productos metabólicos) en un entorno estructurado.

En particular el modelo INDISIM-Plate-NL para este trabajo tiene como propósito:

- Investigar a nivel macroscópico las dinámicas de una colonia de *Escherichia Coli*, el crecimiento de la cual tiene lugar en un medio no planctónico bidimensional cerrado con condiciones aeróbicas y una concentración inicial de nutriente distribuida de manera homogénea.

- Investigar cómo cambian las morfologías de las colonias bacterianas creciendo en superficie como consecuencia de cambios en la concentración inicial de nutriente en el medio y del coeficiente de difusión de este nutriente (según sea el medio, más o menos gelatinoso).

Es un modelo, que se podrá utilizar como punto de partida para la representación aproximada de la realidad observada en el laboratorio con placas de Petri inoculadas con microorganismos, y en procesos de contaminación de alimentos o superficies diversas.

Entidades, variables de estado y escalas

El modelo está compuesto por dos tipos de entidades: las bacterias (microorganismos, *turtles*), y las unidades de ambiente (las celdas espaciales, *patches*) en que se encuentra reticulado el espacio o dominio sobre el que los individuos “viven”. La agrupación de todas las unidades de ambiente da lugar al espacio total simulado.

Las bacterias se encuentran representadas por círculos en las salidas gráficas del sistema simulado, pero se asume como hipótesis que son esferas de 1 μm de diámetro. Tienen tres estados individuales diferentes, viable-óptimo, viable-no-óptimo o no-activo (que para la representación gráfica del sistema tendrán colores diferentes, color lima, naranja o rojo para bacterias viable-óptimas, viable-no-óptimas o no-activas, respectivamente).

Cada microorganismo está caracterizado o definido específicamente por su posición espacial en la superficie simulada (deduciendo por tanto su distancia al centro de la colonia o posición del inóculo inicial), su masa (su volumen y diámetro se pueden deducir a partir de la masa asumiendo que tiene una geometría esférica), el tiempo de

700 viabilidad y la masa de reproducción. Hay otros parámetros que se asignan
701 individualmente y que están ligados al consumo individual de nutriente, al
702 mantenimiento celular individual, al rendimiento o aprovechamiento del nutriente, a la
703 creación de nueva masa, y al tiempo de viabilidad celular.

704 El espacio que simulamos es un cuadrado dividido (reticulado) en pequeños cuadrados
705 (*patches*), cuya posición espacial está controlada por las coordenadas cartesianas enteras
706 (x,y) del *patch*. Cada unidad de ambiente, que puede estar ocupada o no por
707 microorganismos, contiene una cantidad de nutriente que puede cambiar a lo largo del
708 tiempo.

709 El ambiente bidimensional, con dimensiones de $IQ \times IQ \mu m^2$, se encuentra dividido en
710 *patches* de $1 \mu m^2$ (se han ejecutado simulaciones con $201 \times 201 = 40401$ y
711 $401 \times 401 = 160801$ *patches* o μm^2). Cada *patch* o pequeño cuadrado del reticulado
712 caracterizado por la cantidad de nutriente y el número de microorganismos que
713 contiene, se representa gráficamente con tonalidades del color amarillo, según sea la
714 cantidad de nutriente que hay (cuando más nutriente hay más claro es el color y a
715 medida que el nutriente se agota el color se va volviendo más oscuro, hasta que el color
716 negro representa que se ha agotado el nutriente). El total del ambiente se encuentra
717 caracterizado por el coeficiente de difusión (parámetro del modelo) que condiciona la
718 difusión del nutriente, la progresiva redistribución del nutriente en el espacio. El
719 ambiente o sistema simula un medio bidimensional semisólido encerrado en un
720 cuadrado con paredes rígidas (no permeables) que no permiten ni la entrada ni la salida
721 de ningún tipo de elemento, ni de microorganismos ni nutriente.

722 La distancia de cada microorganismo (individuo) al centro de la colonia (posición donde
723 se implanta inicialmente el inóculo puntual y a partir del cual se genera y expande la
724 población microbiana) se utiliza para controlar el radio de la colonia. También el área
725 de la colonia es una variable que se controla a lo largo del tiempo.

726 La evolución temporal del sistema se encuentra dividida en intervalos iguales asociados
727 a lo que llamamos pasos de programa. En este modelo, cada paso de tiempo del
728 programa equivale a 1 minuto y la duración total de las simulaciones puede ser variable
729 en función de valores de los parámetros de entrada o de los objetivos a alcanzar. Por
730 ejemplo, la simulación más larga hecha durante esta investigación ha sido de 70 días
731 (100800 pasos de tiempo).

732 La cantidad de nutriente inicial distribuida en el medio y el valor del coeficiente de
733 difusión serán los dos parámetros que se modificarán para generar diferentes tipos de

escenarios y analizar los diferentes tipos de crecimiento que se producen, así como las diferentes morfologías de colonias bacterianas que aparecen.

Perspectiva del proceso y programación

El esquema de simulación global está principalmente configurado por las siguientes secciones:

- a) Inicialización del sistema simulado cuando los datos de entrada son leídos en relación al inóculo inicial y a sus características, y a la distribución inicial de nutriente en el dominio cuadrado.
- b) Un bucle por paso de tiempo que se repetirá hasta llegar al número final de pasos de programa establecidos. En cada paso de tiempo se encuentran:
 - b1) Una ordenación aleatoria de los individuos de la población que irán “actuando” de forma secuencial y que realizarán las acciones individuales de acuerdo con las reglas de comportamiento diseñadas e implementadas.
 - b2) Las acciones sobre el medio o entorno espacial.
 - b3) La recogida y representación gráfica de los valores de las variables de estado que se controlan. Escritura opcional en un fichero de salida numérico con valores de variables.

El conjunto de reglas de comportamiento para los individuos y las acciones que se producen en el entorno y que se llevan a cabo en cada paso de programa, sobre cada bacteria y sobre cada celda espacial respectivamente, y que siguen el orden dado son:

Procesos aplicados a cada individuo:

- Cambio de estado según sus condiciones internas y sus reservas energéticas (representado por un cambio de color). Una vez los individuos se convierten en no activos ya no realizarán ningún otro proceso.
- Movimiento (por defecto, en este trabajo no se supone movimiento activo).
- Consumo de nutriente.
- Mantenimiento y creación de nueva biomasa.
- Reproducción por bipartición

Procesos aplicados al entorno:

- Difusión de nutriente.
- Coloración (en función de la concentración de nutriente).

La actividad bacteriana se describe localmente, por tanto, las acciones individuales que se producen solo afectan a la celda espacial en el que se encuentra cada bacteria, y la

variable que controla la cantidad de nutriente a cada celda es actualizada en el momento en que modifica su valor. También, la ocupación de las celdas por las bacterias se actualiza en cada momento que cambia.

El consumo de nutriente es la cantidad de alimento o nutriente disponible que coge (o incorpora) el microorganismo de la celda que ocupa y que depende de su masa individual y de la concentración de nutriente que esta celda tiene. El nutriente disponible es la cantidad máxima de nutriente que puede consumir el microorganismo en un paso de tiempo (y que asumimos que corresponde al 50% del nutriente que hay en la celda). Con el consumo de este nutriente un microorganismo se puede mantener viable y puede crear nueva biomasa. El mantenimiento individual (un valor que se calcula en función de la masa de la bacteria) representa la cantidad de nutriente que el microorganismo necesita destinar a cubrir sus necesidades básicas. El tiempo de viabilidad representa el tiempo que se considera que un microorganismo es capaz de soportar funcionando normalmente mientras su gasto energético es negativo, es decir, mientras no consume suficiente nutriente para cubrir su mantenimiento básico. Una vez agotado este tiempo el individuo deja de realizar sus funciones vitales y se inactiva.

La masa de reproducción es la masa mínima necesaria que deben tener los microorganismos para poder iniciar su reproducción. El tiempo de reproducción es el tiempo necesario que debe pasar desde que el microorganismo ha alcanzado la masa mínima para reproducción hasta que realiza la bipartición físicamente, obteniendo dos bacterias aproximadamente iguales en tamaño e idénticas genéticamente (representa el tiempo de replicación del DNA y el tiempo que tardan los cromosomas a separarse hacia los polos de la célula para poder efectuar posteriormente su división).

En cada paso de tiempo se realizan los cálculos de los valores que corresponden a variables derivadas de las variables de estado individuales o del ambiente, número total de individuos, número de individuos en cada uno de los tres estados (viables-óptimos, viables-no óptimos, no activo), área de la colonia y diferentes tipos de radios definidos para caracterizar el tamaño de la colonia, con la consecuente actualización de las representaciones gráficas y la escritura opcional de un archivo de salida numérico. El fichero externo con los datos simulados permite completar el análisis de resultados en una hoja de cálculo o con un paquete estadístico.

Design concepts

Emergencia

La forma y tamaño de la colonia bacteriana en la superficie sobre la que se desarrolla emerge como resultado de las múltiples acciones individuales de las bacterias que la configuran. No se impone ninguna morfología específica ni función matemática para el tamaño de la población (área o radio de la colonia), ni inicialmente ni durante la evolución temporal con la agrupación de bacterias que se va configurando. El agotamiento de la glucosa es consecuencia del consumo por parte de los microorganismos. El exceso o defecto de glucosa influye en el crecimiento individual, la reproducción y el estado de vitalidad de las bacterias, emergiendo diferentes tipos de regiones en el espacio, unas con bacterias no activas en el centro de la colonia y otras con bacterias activas que se encuentran en el perímetro de la colonia compitiendo por el nutriente disponible. El comportamiento global de la colonia emerge de la concentración local de glucosa y del comportamiento individual bacteriano en cada paso de tiempo.

Interacción

Los individuos interaccionan tanto de forma directa como de forma indirecta. Lo hacen directamente “empujándose” durante la reproducción para la ocupación del espacio, cuando un microorganismo se reproduce “empuja” su descendiente a una celda vacía de su alrededor, de forma que los espacios no ocupados se van ocupando por la presión que ejercen las mismas bacterias entre ellas cuando van aumentando en número.

Interaccionan de manera indirecta cuando compiten entre ellas por el consumo de nutriente.

Sensibilidad

A pesar de que no se ha modelizado explícitamente el mecanismo de detección de productos, se asume que los individuos son capaces de percibir la concentración de nutriente que hay en la celda en la que están situados. Como consecuencia de esto, el consumo de nutriente se ajusta a la disponibilidad local de éste. También se asume que los individuos pueden percibir si las celdas de su alrededor están ocupadas o no por otras bacterias, para que el nuevo individuo que aparece durante la bipartición (reproducción) se pueda situar en una celda no ocupada; y que el individuo conoce su propia masa, para poder adaptar el consumo, mantenimiento y reproducción según sea su valor.

Aleatoriedad

En cada paso de tiempo los individuos son llamados a realizar sus acciones en un orden o lista confeccionada de forma aleatoria para evitar tener individuos “privilegiados” por

ser los primeros en “actuar” frente a individuos “castigados” por ser siempre los últimos en “actuar”. En el proceso de la reproducción se sitúa el “descendiente” del individuo que se reproduce (el nuevo individuo) en alguna celda vacía elegida aleatoriamente entre las 8 que rodean su ubicación. Se utilizan variables aleatorias con distribución normal (Gaussiana) cuando queremos obtener valores individuales en cada paso de tiempo para parámetros involucrados en procesos o acciones como: i) distribuciones iniciales de masas microbianas, ii) distribución inicial de nutriente, iii) consumo individual de nutriente, iv) tiempo individual de reproducción; y v) reparto de las masas de los dos individuos resultantes de la bipartición de una bacteria. Las desviaciones estándar de las variables normales se han fijado mayoritariamente al 10% del valor de las esperanzas (medias poblacionales) correspondientes. Esta manera de fijar las dispersiones de las variables normales se corresponde con tener coeficientes de variación del 10%, valores plausibles en el ámbito biológico.

Observación

El comportamiento del sistema se sigue mediante datos relacionados con la colonia bacteriana como objeto global (área y tres definiciones distintas de radio), la evolución temporal de la cantidad de nutriente, el número de bacterias totales y según el estado interno individual, y las distribuciones relacionadas con propiedades individuales de las bacterias como son la distribución de masas y del tiempo de viabilidad. En la Tabla 8 se hace la recopilación de todas las observaciones y se especifica si en la interfaz del simulador creado (Figura3) se muestran en un monitor y/o en una gráfica (como diagrama de dispersión, poligonal, histograma o diagrama de barra), o bien si se recogen en un fichero externo numérico de datos tipo texto para que puede ser posteriormente analizado. Los diferentes tipos de variables que representan estos datos simulados encuentran su contraparte en diferentes tipos de técnicas experimentales utilizadas para el estudio de dichas variables en sistemas reales.

Tabla 8. Observaciones que realiza INDISIM-Plate-NL.

Observación	Nombre	Monitor	Gráfica	Archivo de datos
Número total de microorganismos	<i>Number of microorganisms</i>	x	x	x
Número total de microorganismos de cada estado	<i>Total microorganisms</i>		x	x
Cantidad total de nutriente	<i>Nutrient</i>	x	x	x
Distribución de las masas de los microorganismos	<i>Distribution of mass</i>		x	

Biomasa total	<i>Total-mass</i>		X
Distribución del tiempo de viabilidad de los microorganismos	<i>Distribution of time-viability</i>	X	
Área de la colonia	<i>Colonyarea</i>	X	X
Distancia máxima de un microorganismo al centro de la colonia	<i>Radius1-colony</i>	X	X
Radio equivalente al área de la colonia asumiendo geometría circular	<i>Radius2-colony</i>	X	X
Mediana de las distancias máximas para cada uno de los cuatro cuadrantes	<i>Radius3-colony</i>	X	X

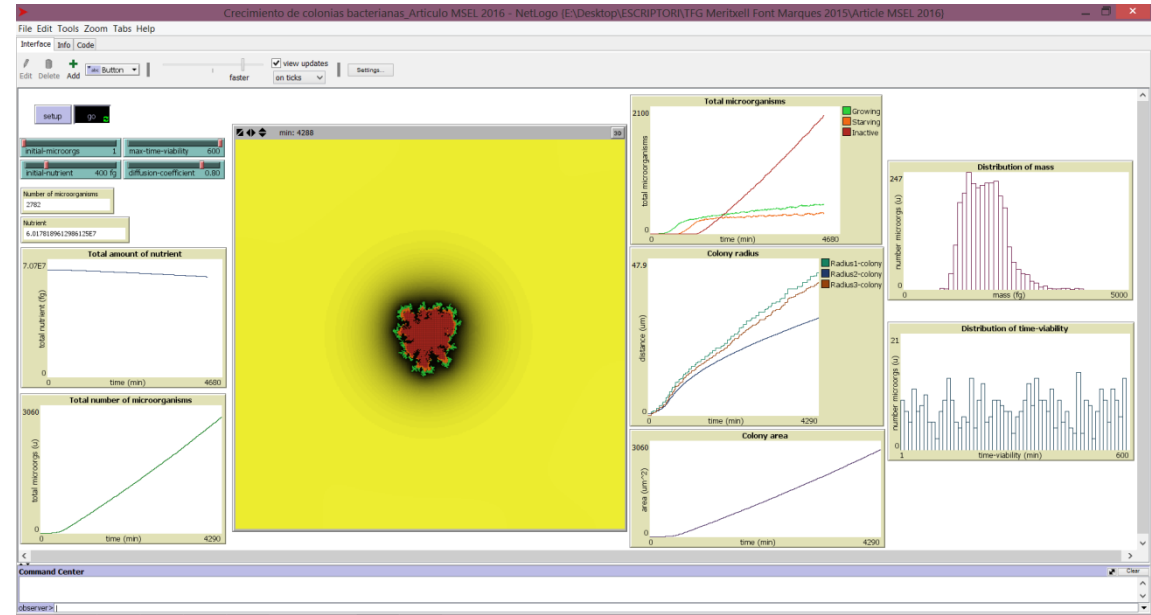


Figura 3. Captura de pantalla de la interfaz del usuario del simulador INDISIM-Plate-NL.

Details

Inicialización

Al inicio de la simulación se sitúa un individuo (o unos pocos individuos) en el centro del ambiente configurado, el centro del cuadrado, para representar así un inóculo bacteriano puntual. El número inicial de microorganismos se puede hacer variar a partir de un *slider* (botón deslizante) de la interfaz del programa (por ejemplo, entre 1 y 10 individuos). Los individuos iniciales creados se sitúan en la celda central de coordenadas (0,0), el centro del ambiente que es un cuadrado de 401x401 celdas, con los vértices en (-200, -200), (-200,200), (200,200) y (200, -200). Se asume que todos los individuos iniciales son viables-óptimos (color lima). A cada microorganismo se le

asigna una masa inicial, a partir de una distribución normal con una media de 2880 fg y una desviación estándar de 288fg. Se considerará que esta masa es la masa de reproducción promedio de las bacterias. El valor que toma la masa inicial de los microorganismos se basa en la relación de los valores del volumen celular con la tasa específica de crecimiento que utiliza el trabajo de Tack et al. (2014). En nuestro modelo, para manejar órdenes de magnitud comparables con datos experimentales, calculamos la masa inicial tomando una tasa máxima específica de crecimiento de 0.0088 min^{-1} que corresponde aproximadamente a un volumen celular de 2.5 fL (Tack et al., 2014). Con la asunción de que los microorganismos tienen forma esférica, y sabiendo que 1 fL es equivalente a $1 \mu\text{m}^3$, se obtiene el radio inicial de los individuos igual a 0.84 μm . La densidad de biomasa celular (ρ) de *Escherichia coli* K-12 MG1655 es de 1160 fg/fL (Godin, Bryan, & Burg, 2007) y con la relación $\rho=m/V$, donde m es la masa de cada microorganismo y V su volumen, obtenemos la masa inicial de los individuos (resultando el valor fijado 2880 fg). Las variables internas individuales de control “*maintenance*” y “*repr_time*” tienen al iniciar la simulación el valor 0, y la variable “*time-viability*” tiene el valor máximo establecido para la resistencia individual de la bacteria en situaciones de estrés (el “*max-time-viability*” que puede ser de, por ejemplo, 250 min).

Se asigna a cada una de las celdas del dominio una cantidad inicial de nutriente a partir de una variable aleatoria normal con esperanza igual al fijado en la interfaz del simulador (“*initial-nutrient*”) y desviación estándar el 5% de este valor. El valor de la concentración inicial de nutriente se puede elegir en el rango de 0-1500 fg del *slider* correspondiente (suponiendo, por ejemplo, que es glucosa, que es el caso de las simulaciones que se presentan). Se fija también el coeficiente de difusión del nutriente en un rango de valores desde 0.01 hasta el valor 1, y asumimos que este parámetro se relaciona con la cantidad de agar o gel en el dominio (dependiendo la tipología de estructura del ambiente). Un coeficiente de difusión pequeño se corresponde con un medio con mucho agar mientras que un coeficiente próximo al valor 1 indica un medio con poco agar. Se representa gráficamente la cantidad de nutriente en el ambiente para visualizar su distribución espacial a lo largo del tiempo con una coloración de intensidad proporcional a la cantidad que hay en cada celda del dominio. La intensidad de color amarillo se ajusta a la cantidad de nutriente que tiene cada celda, donde hay más nutriente el color es más claro, y donde hay menos nutriente la intensidad del

911 amarillo va desapareciendo y se va oscureciendo, hasta que puede llegar a ser negro si
912 no hay nutriente en esa celda.

913 Entrada

914 El modelo no utiliza ningún tipo de dato externo de entrada para representar procesos
915 que varían con el tiempo.

916 Sub-modelos

917 Los procesos aplicados a individuos se ejecutan en cada paso de tiempo y para cada uno
918 de los individuos de la colonia, y los resultados de los cambios que se producen se
919 asignan a las variables de estado de cada individuo y a las de los *patches* si es el caso,
920 de forma que se mantienen las variables actualizadas para el siguiente paso de tiempo.

921 Cambio de estado interno del individuo. Las bacterias ingieren una cantidad de
922 nutriente en cada paso de tiempo según las condiciones individuales y del entorno local.
923 Dependiendo de la cantidad de nutriente absorbido, el contador interno de los
924 individuos, el “*time-viability*”, aumentará en una unidad (si consumen suficiente
925 nutriente como para satisfacer el mantenimiento celular) o disminuirá (si no consumen
926 suficiente nutriente como para satisfacer el mantenimiento y necesitan recurrir a la
927 degradación de parte de su propia masa). Cuando el tiempo de viabilidad es inferior al
928 75% del tiempo de viabilidad máximo (“*max-time-viability*”), se considera que el
929 microorganismo está en un estado no óptimo (con un cierto estrés por limitación de
930 energía) y se le asigna el estado “*Starving*” (color naranja como referencia visual). Si
931 este contador es superior al 75% del tiempo de viabilidad máximo se le asigna el estado
932 “*Growing*” (color lima como referencia visual), y es un estado óptimo, ya que, los
933 individuos disponen de suficiente nutriente para crear nueva masa y crecer o bien, a
934 pesar de haber degradado biomasa, han podido alcanzar los requerimientos energéticos.
935 Cuando el tiempo de viabilidad es inferior a 1 se considera que el microorganismo ha
936 estado demasiado tiempo con condiciones muy desfavorables, que ha degradado gran
937 parte de su masa y pasa a ser no viable e inactivo, estado “*Inactive*” (color rojo como
938 referencia visual). Una vez el individuo entra en este último estado no realiza más
939 procesos o acciones individuales.

940 Consumo de nutriente. El consumo de glucosa individual (upt) varía dependiendo de la
941 concentración de nutriente de la celda espacial o *patch* en el que se encuentran los
942 individuos y de su propia masa. El consumo que se asigna al individuo ha sido diseñado
943 a partir de la ecuación que utiliza Tack et al. (2014) en su modelo. Donde $\mu_{max,m}$ es la
944 tasa máxima de crecimiento celular, i un valor aleatorio de una variable normal de

esperanza 0 y desviación típica 0.10 (para introducir aleatoriedad en la acción individual), ρ_x es la densidad de la biomasa, *nutrient* es la concentración de nutriente disponible en el propio *patch*, *mass* es la masa del individuo, $Y_{X/S}$ es el coeficiente de conversión de masa a nutriente y k_s es la constante de saturación de Monod:

$$upt = \frac{\mu_{max,m} \cdot (1+i) \cdot \rho_x \cdot nutrient \cdot mass}{Y_{X/S} \cdot (k_s + nutrient)} = \frac{0.0088 \cdot (1+i) \cdot 0.26 \cdot nutrient \cdot mass}{0.45 \cdot (0.00539 + nutrient)} \quad (1)$$

Se ha incorporado la densidad de la biomasa de los individuos, calculada a partir de la densidad de biomasa celular (ρ) que se considera 1160 fg_{masa total}/fL, y la densidad de biomasa celular seca (ρ_{ms}) que se considera 301.6 fg_{masa seca}/fL (Tack et al., 2014), de modo que:

$$\rho_x = \frac{\rho_{ms}}{\rho} = \frac{301.6}{1160} \rightarrow \rho_x = 0.26 fg_{masa seca} / fg_{masa total} \quad (2)$$

Una vez se tiene asignado un valor por el consumo de nutriente del individuo (*upt*), se compara con el nutriente disponible (“*ava_upt*”) del *patch* que ocupa para asegurar que el consumo que se quiere realizar sea posible. Si resultara que el consumo calculado fuera más elevado que el nutriente disponible, el individuo sólo absorbería el nutriente disponible. Una vez fijado el consumo final de glucosa que el individuo llevará a cabo, esta cantidad se resta a la cantidad de nutriente que contiene el *patch*.

Mantenimiento y creación de nueva biomasa. El nutriente que consumen los individuos (fg de glucosa) se utiliza para el mantenimiento celular y una vez cubierto este mantenimiento, el nutriente restante se destina directamente a la formación de nueva biomasa o crecimiento individual. Cuando se produce la situación que el nutriente asimilado no es suficiente para cubrir el mantenimiento, el déficit de glucosa se compensa mediante la degradación de la cantidad equivalente de biomasa que le proporciona la energía necesaria para su mantenimiento.

A partir de la cantidad real de nutriente que se absorbe y de la cantidad que se necesitaría para el mantenimiento celular, se establece la cantidad de nutrientes sobrante o que falta del balance de estos dos factores. El coeficiente de mantenimiento (*coef_{mant}*) es de 0.00099 fg_{nutriente}/(fg_{masa seca} min) (Tack et al., 2014):

$$upt_{unused} = upt - coef_{mant} \cdot \rho_x \cdot mass \quad (3)$$

En caso de que *upt_{unused}* sea un valor positivo, el nutriente no utilizado por el mantenimiento celular se destinará a la creación de nueva biomasa bacteriana, donde $Y_{X/S}$ es el coeficiente de masa-nutriente, rendimiento individual, y se fija en el valor de 0.45 fg_{masa seca}/fg_{nutriente} (Tack et al., 2014):

$$mass_{created} = upt_{unused} \cdot Y_{X/S} \cdot \frac{1}{\rho_X} \quad (4)$$

La nueva masa que se forma se añade al valor de masa individual de la bacteria y se suma un paso de tiempo al contador interno “*time-viability*”, indicando que la bacteria se encuentra en un entorno favorable.

En caso de que upt_{unused} resulte ser un valor negativo, y si la masa del individuo no es excesivamente pequeña, es decir, es superior al 25% de la masa inicial fijada (2880 fg), se resta a la masa actual de la bacteria la cantidad de masa que se necesita ($mass_{needed}$) para cubrir lo que falta de mantenimiento:

$$mass_{needed} = (-upt_{unused}) \cdot Y_{X/S} \cdot \frac{1}{\rho_X} \quad (5)$$

En esta situación, a la variable “*time-viability*” se le resta uno, reflejando que la bacteria se encuentra en un entorno con condiciones desfavorables.

Reproducción por bipartición. Cuando la masa de la bacteria supera una masa mínima fijada para poderse reproducir, y que se ha establecido en el mismo valor que la masa inicial (2880fg), se activa un contador interno (“*repr_time*”). Esta variable individual cuenta los pasos de tiempo que van pasando desde que se alcanza la masa mínima de reproducción hasta un valor que se fijará en cada paso de tiempo y que será un valor aleatorio obtenido de una variable aleatoria normal de esperanza 60 (min) y desviación típica 6 (min). Se asume que este tiempo equivale al tiempo necesario para replicar la información genética, proceso que está compuesto por dos fases, la fase C cuando se replica el ADN y la fase D cuando se segregan los cromosomas hacia los polos opuestos de la célula (Maaloe & Kjeldgaard, 1966), siendo estas dos fases de duraciones aproximadas de 40 y 20 minutos respectivamente (Cooper & Helmstetter, 1968). Alcanzado este tiempo de preparación para la reproducción, la célula se divide en dos células casi idénticas en cuanto a la masa (reparto de masa a partir de un sorteo aleatorio de media 0.5 y desviación típica 0.05). Con el procedimiento “*newborn-spot*” se ha modelizado la aparición de un individuo nuevo que pasara a ubicarse en una posición o celda vecina vacía, no ocupada. En el caso de no encontrar esta posición libre para ocupar, el nuevo individuo se quedará en la celda espacial de origen (la ocupada por su progenitor).

Difusión de nutriente. La difusión se ha aplicado con la función que tiene la plataforma NetLogo “*diffuse*” que aproxima la difusión de nutriente distribuyendo una parte del nutriente que se encuentra en el *patch* determinada por el coeficiente de difusión de forma equitativa a sus 8 *patches* vecinos que lo rodean. El valor del coeficiente de

1010 difusión del nutriente en el medio se puede fijar como un parámetro de entrada del
1011 modelo para cada simulación (“*diffusion-coeficiente*”).

1012 Coloración. En cada paso de tiempo, las intensidades de color amarillo de los *patches*
1013 del dominio cambiaran en función de la cantidad de nutriente que contiene cada uno de
1014 estas celdas. Cuanto más nutriente hay en el *patch* más claro es su color y a la inversa,
1015 cuanta menos cantidad de nutriente en el *patch* más oscuro es éste.

1016 Al finalizar las acciones individuales y las acciones sobre el dominio en el paso de
1017 tiempo establecido, se realizan los cálculos de los valores de las variables no directas a
1018 partir de variables directas controladas, como son por ejemplo el área de la colonia y los
1019 diferentes radios definidos para representar el radio de la colonia bacteriana. Para
1020 calcular el área de la colonia simplemente se suman todos los *patches* del dominio en
1021 los que hay algún individuo, ya que, el área de cada celda es de $1 \mu\text{m}^2$. Atendiendo a
1022 que la morfología de una colonia bacteriana es irregular y cambiante, se utilizan tres
1023 definiciones diferentes para su radio, de manera que dependiendo de cómo se está y de
1024 cómo se expanda en la superficie, se pueden aproximar más o menos a lo que sería un
1025 radio de la agrupación de bacterias. El “*radius1-colony*” es la distancia desde el centro
1026 de la colonia (posición del inóculo inicial) al individuo que se encuentra más lejos. Es
1027 un radio adecuado cuando la morfología es aproximadamente redondeada y compacta.
1028 El “*radius2-colony*” sería el radio equivalente a un círculo que tuviera por área el área
1029 de la superficie ocupada por la colonia. En este caso, si tuviéramos una morfología muy
1030 ramificada, el radio que obtendríamos sería bastante inferior a la distancia del individuo
1031 más lejano del centro, ya que, la superficie total ocupada por una colonia como esta
1032 sería pequeña pero podría haber individuos ocupando posiciones alejadas del centro y
1033 zonas de la superficie sin ocupar. El “*radius3-colony*” se calcula haciendo una media de
1034 los cuatro radios que se obtienen al buscar la distancia del individuo situado más lejos
1035 del centro de la colonia en cada uno de los cuatro cuadrantes del dominio
1036 bidimensional. Este radio suavizaría el hecho de que una rama de la colonia destaque y
1037 crezca por delante de otras ramas a lo largo de su evolución, rompiendo la simetría
1038 radial que se puede esperar en un dominio donde el nutriente inicial se encuentra
1039 uniformemente distribuido.

1041 **EL SIMULADOR INDISIM-Plate-NL: IMPLEMENTACIÓN DEL MODELO EN**

1042 **LA PLATAFORMA NETLOGO**

Como ya se ha mostrado en la Figura 3, la implementación del modelo en la plataforma NetLogo (de acceso abierto y entorno amigable para usuarios) permite interactuar directamente con el simulador. Los autores pueden enviar el simulador a petición del lector interesado para que pueda ser utilizado directamente. INDISIM-Plate-NL es accesible tanto para usuarios de Windows, Linux o Mac OS X, pues la descarga gratuita de NetLogo desde su web contempla estas tres opciones. En el anexo se halla el código de computación en el que se pueden identificar todas las partes del programa correspondientes a la descripción previamente hecha del modelo siguiendo el protocolo ODD. Conociendo la interfaz de usuario y el código del programa, el lector podría reimplementar el modelo puesto que toda la información que necesita es visible en la captura de pantalla proporcionada en la Figuras 3 y en el anexo. Los valores iniciales que se han incorporado en el modelo, y que utiliza por defecto el simulador, se pueden cambiar, de forma que se pueden generar escenarios de simulación diversos. El dominio cuadrado de la interfaz del usuario (Figura 3) permite seguir como evoluciona y se expande la colonia bacteriana virtual creada sobre la superficie a partir de un inóculo puntual inicial en el entorno bidimensional donde se encuentran los nutrientes, y las salidas gráficas nos dan las evoluciones temporales y las distribuciones de características individuales de forma sincronizada a la simulación que se está realizando.

SIMULACIONES CON INDISIM-Plate-NL

Estudio del crecimiento de una colonia bacteriana de *Escherichia Coli* a partir de un inóculo puntual en una superficie con distribución inicial uniforme de nutriente

En este apartado se comparan los resultados obtenidos con el simulador INDISIM-Plate-NL con los que se obtuvieron con el modelo MICRODIMS y que son parte del trabajo publicado por Tack et al. (2014), el trabajo que ha proporcionado fundamentalmente la parametrización de nuestra bacteria.

Lo primero que se analizó con el simulador desarrollado fueron las limitaciones de difusión del nutriente en el medio y cómo la alta concentración de individuos en el centro de la colonia (allí donde se encuentra el inóculo puntual inicial para iniciar el crecimiento) provoca el agotamiento de este nutriente con la aparición de zonas en la colonia de no crecimiento frente a otras zonas situadas en la periferia de la colonia de crecimiento (Figura 4). La disminución o disponibilidad de la glucosa (inicialmente distribuida de forma homogénea) se ve muy influenciado por el valor de la

concentración inicial y por su difusión en el medio. Cuando estos valores iniciales de glucosa son bajos los individuos se quedan sin nutriente muy rápidamente como muestran simulaciones realizadas con INDISIM-Plate-NL. También, para una determinada concentración de glucosa, en condiciones de baja difusión, la baja concentración de nutrientes que los individuos deben soportar cuando pasa el tiempo generan colonias microbianas pequeñas y de crecimiento muy lento. Estos patrones o tipos de comportamientos son los que se corresponden con el conocimiento experimental y previo que se tiene sobre colonias bacterianas, ya que su formación y evolución está muy condicionada por la cantidad de nutriente que llega a las partes activas de estas colonias (Tack et al., 2014). Otro aspecto que se estudió fue el radio de la colonia bacteriana a lo largo del tiempo, o distancia de las bacterias de la periferia de la colonia al centro de la colonia, el cual es el origen de su formación (ubicación inicial del inóculo). La evolución temporal de esta variable radio está relacionada con el hecho de que en el centro de la colonia están las células con poco nutriente (o sin nutriente) y en la periferia de la colonia están las células activas, las que están creciendo y se están reproduciendo gracias al nutriente que pueden conseguir como consecuencia de su difusión, como se observa en la Figura 4. En el caso del crecimiento de una colonia compacta en forma redondeada o lobular como el que se muestra la Figura 4, el radio de la colonia (el *radius2-colony* definido previamente) muestra una evolución suave, con una transición desde un crecimiento exponencial a un crecimiento lineal que coincide con la aparición de células bacterianas que empiezan a mostrar la falta de nutriente (los estados individuales de las bacterias pasan de ser estados activos a estado no activo según sea su localización en la colonia, Figura 4). Se constata con este comportamiento que no se trata de crecimiento planctónico como el que se tendría en un medio líquido. Cuando la expansión de la colonia progresa únicamente unos pocos microorganismos, situados en una pequeña franja en el exterior de la colonia pueden absorber nutriente y, consecuentemente, crecer y reproducirse. Como consecuencia del agotamiento de nutriente en el centro de la colonia sólo los individuos exteriores en la periferia de la colonia, situados en entornos donde todavía hay nutriente cumplen con los requerimientos de mantenimiento y, en algunos casos, pueden crear nueva biomasa (Figura 4). A medida que hay más agotamiento de nutrientes, la morfología de la colonia pasa de ser circular lisa a ser cada vez más lobular. Estos resultados se encuentran en buena concordancia con los resultados presentados en el trabajo de Tack et al. (2014) considerando que ellos toman la medida de su reticulado de 2 μm y que no

utilizan los mismos submodelos para la difusión y el movimiento de los microorganismos.

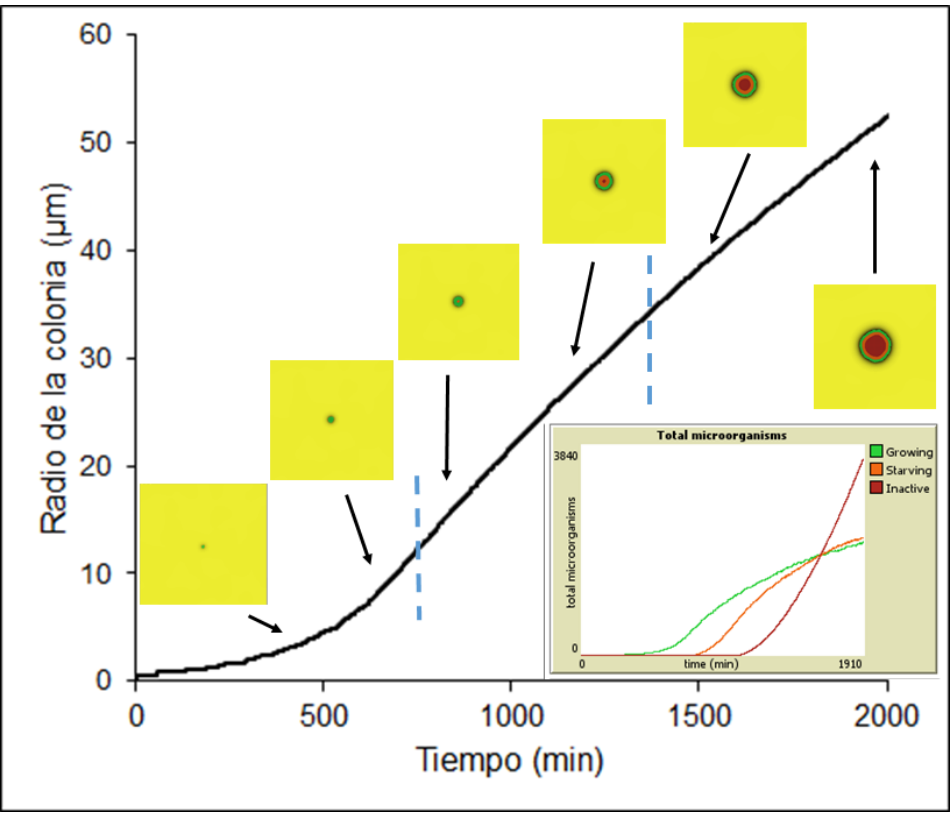


Figura 4. Evolución temporal y espacial de una colonia bacteriana virtual. Simulación hecha con INDISIM-Plate-NL con una concentración inicial uniforme de nutriente y un inóculo puntual. Esta evolución temporal del radio de la colonia puede ser dividida en tres fases, indicadas con las líneas azules discontinuas, una fase de crecimiento exponencial, una fase lineal después de una disminución de nutriente importante en la zona ocupada por la colonia, y una fase de transición entre ellas. Las bacterias activas, que pueden mantenerse, crecer y reproducirse corresponden a las franjas de color naranja y verde de la colonia, mientras que en el centro el color rojo indica la ocupación del espacio por bacterias no activas. La captura de pantalla del simulador con la evolución temporal del número de bacterias según sus estados individuales se corresponde con el comportamiento macroscópico observado de la expansión de la colonia.

El trabajo de Tack et al. (2014) sólo mostró la morfología de colonia redondeada o lobular, sin embargo, se conoce y han sido publicados numerosos trabajos que muestran otras morfologías de colonias bacterianas creciendo en superficie (por ejemplo,

Fujikawa & Matsushita, 1989 y 1991; Matsushita & Fujikawa, 1990; Ben-Jacob, Cohen, & Gutnick, 1998; Ginovart et al., 2002b). En este trabajo, y una vez parametrizado y calibrado el modelo INDISIM-Plate-NL, también se quiere abordar el estudio de otras morfologías de colonias que son dependientes tanto de las características de los propios microorganismos como de las condiciones o propiedades del medio en el que la población crece.

Diferentes morfologías de colonias bacterianas creciendo en superficie según las características del medio

La morfología ramificada de la colonia bacteriana formando diferentes tipos y tamaños de ramas ha sido observada experimentalmente (Fujikawa & Matsushita, 1989), a partir del crecimiento de un inóculo bacteriano puntual en una superficie con nutriente. Esta morfología también se ha podido conseguir con el simulador creado INDISIM-Plate-NL como muestra la Figura 5. En esta figura se pueden apreciar algunas ramas de la colonia bacteriana que están creciendo de forma continua y otras ramas que crecieron inicialmente pero que dejaron de crecer y no evolucionaron más por falta de nutriente (zona de color oscuro en el medio). Aquellas ramas que desde el principio crecieron de forma más vigorosa son capaces de seguir creciendo y hacerse más largas, ocupando mayor superficie y expandiendo a la colonia. En las simulaciones, a partir del inóculo inicial ubicado en la parte central del dominio bidimensional, la colonia crece gracias al consumo de partículas de nutriente que llegan a los microorganismos a través del proceso de difusión. La cantidad y la continuidad de las partículas de nutriente que absorben los individuos afectan al tamaño y a la forma de la colonia, las estructuras que desarrolla y el tiempo de formación de éstas. La colonia sólo se expande en la superficie cuando los microorganismos situados en *patches* donde hay nutriente son capaces de reproducirse (ya que, en este trabajo y para esta versión del modelo, se ha asumido que los individuos no tienen movimiento propio). Por lo que la ocupación de la superficie por parte de la colonia bacteriana se produce únicamente como consecuencia de la aparición de nuevos individuos.

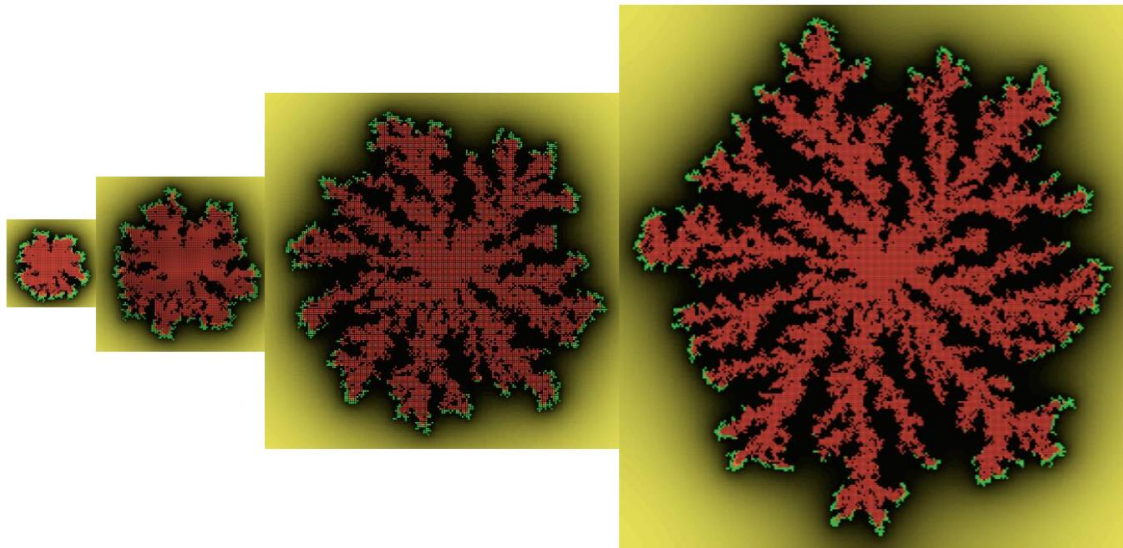


Figura 5. Diferentes etapas del crecimiento de una colonia bacteriana que se corresponde a una morfología ramificada, estructura que también se conoce como agregación limitada por difusión. Este tipo de crecimiento se genera fijando una cantidad inicial de nutriente de 500 fg/patch, distribuido inicialmente de forma uniforme, y con una estructura del medio a la que se asocia un coeficiente de difusión de 0.40.

Además de este tipo de morfología ramificada, otros tipos de morfologías de colonias bacterianas se han obtenido con el simulador INDISIM-Plate-NL, haciendo crecer inóculos virtuales en una superficie y bajo diferentes condiciones de medio. Los diversos escenarios de simulación se han obtenido variando la concentración inicial de nutriente y el valor del coeficiente de difusión (el cual está estrechamente relacionado con la estructura o tipo de medio). De forma aproximada, un medio más gelatinoso y menos líquido tendría un coeficiente de difusión menor que el que correspondería a un medio menos gelatinoso y más líquido (coeficiente de difusión mayor). El crecimiento de inóculos puntuales centrales, inicialmente iguales pero implementados en condiciones de medio diferentes, atendiendo a estos dos factores (concentración de nutriente y difusión de nutriente) permitieron observar la generación de morfologías diversas para las colonias bacterianas en las simulaciones realizadas con INDISIM-Plate-NL.

Se ejecutaron varias simulaciones variando el valor del coeficiente de difusión (desde 0.05 hasta 1) y la concentración homogénea inicial de nutriente en el entorno (desde 20 a 55 fg/patch o fg/ μm^2), consiguiendo diferentes morfologías de colonias bacterianas

1185 observadas experimentalmente (Ben-Jacob, Cohen, & Gutnick, 1998; Fujikawa &
1186 Matsushita, 1989 y 1991; Matsushita & Fujikawa, 1990). La Figura 6 muestra los
1187 cambios morfológicos de la colonia que se producen durante el crecimiento de las
1188 bacterias en función de la concentración inicial de nutriente (glucosa) y concentración
1189 de agar en una placa o ambiente donde se encuentra la evolución del sistema microbiano
1190 (representado por el coeficiente de difusión, a mayor concentración de agar en placa
1191 menor difusión de nutriente, mientras que a menor concentración de agar en placa
1192 mayor difusión de nutriente).
1193

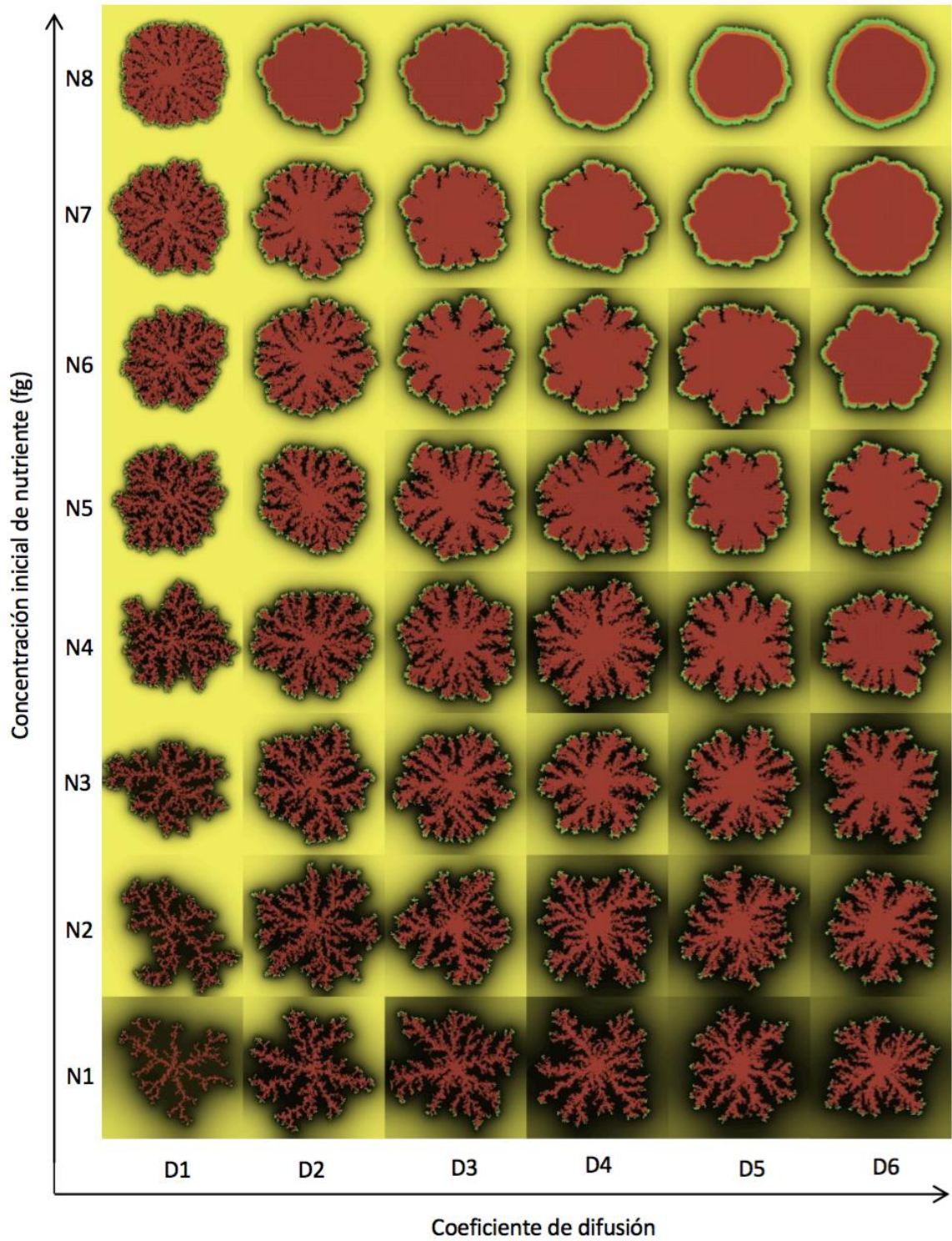


Figura 6. Varias morfologías de colonias bacterianas simuladas con el INDISIM-Plate-NL creciendo en superficie con diferentes concentraciones iniciales de glucosa expresadas en *fg/patch*, donde N1=20, N2=25, N3=30, N4=35, N5=40, N6=45, N7=50, N8=55, y diferentes coeficientes de difusión en el medio, D1=0.05, D2=0.20, D3=0.40, D4=0.60, D5=0.80, D6=1.

En las simulaciones con un inóculo puntual (una bacteria en el centro del dominio cuadrado) la colonia que se va desarrollando crece gracias al consumo de partículas de nutriente que llegan a los individuos a través de su difusión, a medida que va disminuyendo el nutriente más próximo y accesible. La cantidad de partículas y el ritmo con que las absorben los individuos afectan a la estructura, la forma y el tiempo de formación de las colonias. Éstas sólo se expanden en la superficie cuando los microorganismos situados en *patches* donde hay nutriente (y que por tanto pueden aumentar su biomasa) se reproducen, pues se ha asumido que los individuos no tienen movimiento propio activo (en esta versión del modelo), con lo que la ocupación del espacio se produce con la aparición de nuevos individuos ocupando nuevos *patches*. Los resultados simulados que se han obtenido están en buena correspondencia con resultados experimentales publicados (Fujikawa & Matsushita, 1989 y 1991; Matsushita & Fujikawa, 1990) y con resultados simulados conseguidos con otros modelos o simuladores (Ginovart et al. 2002c; Ben-Jacob, Cohen, & Gutnick, 1998). Se observa que cuando más alta es la concentración inicial de nutriente, más se reproducen los microorganismos y, por tanto, más circular, compacta y llena de individuos es la estructura redondeada de la colonia (Figura 6 (N7 o N8)). Se produce una situación similar cuando se aumenta el coeficiente de difusión del medio (Figura 6 (D5 o D6)), ya que el nutriente se va distribuyendo de forma más homogénea y rápida entre los *patches* del dominio, y en menos tiempo llega más nutriente a más individuos. En cambio, tanto si se reduce la concentración inicial de nutriente como si se disminuye el coeficiente de difusión, la colonia tiende a tener una forma más ramificada con ramas cada vez más delgadas, ya que los frentes con actividad celular se localizan en las zonas más emergentes y sobresaliendo en la búsqueda de nutriente disponible. El color o entorno oscuro del medio delata las zonas con muy poco, o sin, nutriente, y en las diversas morfologías de las colonias se puede comprobar que el grueso de la periferia microbiana más “activa” (color lima) de la colonia es diferente en cada caso (Figura 6). En condiciones extremas, por ejemplo con una concentración inicial de nutriente muy baja y un valor para el coeficiente de difusión muy pequeño (Figura 6 (N1-D1)), la colonia bacteriana simulada tiende a formar ramificaciones más delgadas, finas y largas con un crecimiento muy lento. Las salidas que proporciona el simulador permitirían trabajar en un futuro próximo, cuando se pueda disponer de datos experimentales, con evoluciones temporales diversas como por ejemplo, población total de la colonia, relación entre el número de individuos activos (los viable-óptimos y los viable-no-óptimos) e individuos

no activos, o número de individuos viables-óptimos respecto al número total, o bien conocer la población final o extensión de la colonia alcanzada al agotarse el nutriente, según combinaciones de los dos factores principales estudiados, nutriente inicial y cantidad de agar o coeficiente de difusión.

También se podrían estudiar algunas medidas o índices que permitieran caracterizar la morfología de una colonia bacteriana. Por ejemplo, en relación al radio de la colonia, y utilizando las tres variables programadas en el simulador, *Radius1-colony*, *Radius2-colony*, *Radius3-colony*, la Figura 7 muestra las evoluciones temporales de los tres radios para dos colonias diferentes simuladas previamente N1-D1 y N8-D6 de la Figura 6. Dependiendo de la morfología de la colonia, parece razonable complementar la información que proporciona una de las definiciones de radio de colonia con otras posibles definiciones. Cuando la colonia tiene una morfología muy ramificada desde el momento en que empieza a generarse y expandirse, los valores de los tres radios son diferentes desde el principio, y esta diferencia se acentúa de forma evidente a medida que avanza el crecimiento microbiano, como muestra la Figura 7 con la evolución de la colonia N1-D1. Debido a su forma poco redondeada, irregular y no simétrica, y muy poco compacta, los pocos individuos que van generando la colonia N1-D1 tienden a ubicarse en el espacio de forma lenta y desigual (hay poco espacio ocupado por microorganismos). Mientras que para una colonia con morfología más circular y muy compacta, y crecimiento rápido, como el que muestra la colonia N8-D6, las evoluciones de los tres radios son muy similares durante la mayor parte del crecimiento bacteriano (Figura 7).

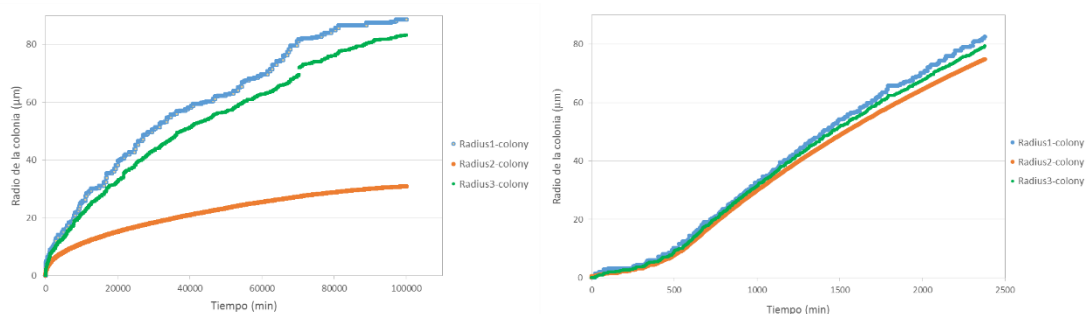


Figura 7. Evoluciones temporales de las tres variables calculadas por el simulador INDISIM-Plate-NL relativas a las tres definiciones de radio de la colonia (*Radius1*, *Radius2*, *Radius3*) que corresponden a las colonias N1-D1 (izquierda) y N8-D6 (derecha) de los escenarios de simulación mostrados en la Figura 6.

1264

1265 **CONCLUSIONES**

1266 Se ha realizado una búsqueda bibliográfica de trabajos publicados sobre la modelización
1267 del crecimiento microbiano no planctónico (crecimiento microbiano en medio
1268 heterogéneo y de movilidad reducida) con el fin de conocerlos modelos
1269 computacionales utilizados, y se han seleccionado diez trabajos. Estos 10 trabajos han
1270 sido analizados con detalle, identificando las principales propiedades y características
1271 de los diseños de los modelos articulados y de sus implementaciones en entornos de
1272 programación. Este análisis ha facilitado su comprensión y ha permitido su
1273 comparación. Se ha constatado que el desarrollo y uso de modelos computacionales en
1274 este ámbito de aplicación microbiológica es relativamente nuevo, y que en el ámbito
1275 educativo estos tipos de modelos son prácticamente desconocidos. Estos modelos,
1276 mayoritariamente, forman parte de una investigación avanzada y de alto nivel, y es en
1277 este entorno donde los respectivos simuladores tienen su sentido y encuentran su
1278 espacio. No son modelos ni simuladores accesibles que puedan ser transportables y
1279 utilizados en procesos de enseñanza y aprendizaje en el aula. A pesar de que las
1280 aplicaciones que presentan estos trabajos pueden ser de gran interés en un entorno
1281 educativo relacionado con la microbiología aplicada o la biotecnología, la información
1282 que proporcionan estas publicaciones hace muy difícil, por no decir imposible, el uso de
1283 estos modelos y sus correspondientes simuladores. Se encuentran fuera del alcance
1284 curricular plausible de los planes de estudio de la mayoría de contextos académicos,
1285 tanto en cuanto a su detalle y profundidad de conceptos en el ámbito microbiológico
1286 como en cuanto al *software* específico que utilizan para el desarrollo y creación de los
1287 simuladores (las partes tangibles de los modelos computacionales). Además, por su
1288 propia naturaleza, estos modelos computacionales son muy complicados de replicar, y
1289 por tanto es muy difícil, por no decir imposible, que se puedan transportar al ámbito
1290 educativo. No son apropiados para poder realizar en el aula experimentos virtuales del
1291 comportamiento de estos sistemas bacterianos creciendo en medios heterogéneos y de
1292 movilidad reducida.

1293 Se ha diseñado y desarrollado con éxito un modelo basado en el individuo, INDISIM-
1294 Plate-NL, para el estudio de poblaciones bacterianas creciendo en superficie, en
1295 entornos heterogéneos y de movilidad reducida. Se ha implementado en la plataforma
1296 de acceso libre NetLogo, un entorno amigable de programación y muy intuitivo que
1297 hace posible el uso de este simulador en el ámbito educativo. Se ha realizado una

completa descripción del modelo con el protocolo ODD y se ha proporcionado una copia del código completo de programación así como de la interfaz del simulador INDISIM-Plate-NL. También se ofrece al lector interesado la posibilidad de poder disponer de INDISIM-Plate-NL bajo petición expresa dirigida a los autores. Todo esto garantiza su transportabilidad a cualquier entorno educativo que se considere adecuado e interesante, facilitando su uso en procesos de enseñanza y aprendizaje del crecimiento no planctónico.

El modelo ha sido parametrizado para la bacteria *Escherichia coli* y ha permitido ilustrar y profundizar sobre el estudio del comportamiento de una colonia bacteriana creciendo en una superficie. INDISIM -Plate-NL ha proporcionado evoluciones temporales y espaciales de estos sistemas microbianos creciendo en un medio no líquido bidimensional y de movilidad reducida. Dos factores significativos implicados en el comportamiento de este tipo de sistema, la concentración inicial de nutriente y la cantidad de agar en el medio (elemento limitante del movimiento de las bacterias y de la difusión del nutriente) han sido investigados con el simulador INDISIM -Plate-NL. Se han generado y reproducido morfologías diversas de colonias bacterianas observadas en trabajos experimentales. También los resultados simulados obtenidos con INDISIM -Plate-NL, en relación al comportamiento de estas colonias bacterianas sobre superficies, están en buena concordancia con otras simulaciones generadas por otros modelos computacionales publicados con anterioridad. Estos primeros resultados conseguidos garantizan el valor de INDISIM -Plate-NL en el ámbito académico, al tiempo que lo posiciona favorablemente para que pueda ser adaptado, ampliado o sofisticado para estudios posteriores y más específicos, formando parte de actividades de modelización, programación y simulación en el ámbito de los sistemas microbianos. Investigaciones y estudios de sistemas microbianos con estas características son de gran interés en ámbitos como por ejemplo la contaminación de alimentos, deterioro de superficie de estructuras en contacto con actividad microbiana, o regeneración y recuperación de ciertos entornos a través de la inoculación de microorganismos específicos, donde los modelos más tradicionales, clásicos y conocidos de crecimiento microbiano en medio líquido no se pueden utilizar. Confiamos en que INDISIM-Plate-NL pueda ser de interés para sectores académicos determinados y adecuado para poder ser utilizado en el contexto educativo, en el aula, para generar experimentos virtuales y avanzar en la comprensión y análisis de estos sistemas bacterianos creciendo en medios no líquidos, heterogéneos y de movilidad reducida.

1332

1333 **BIBLIOGRAFÍA**

- 1334 Ben-Jacob, E., Cohen, I., & Gutnick, D.L. (1998). Cooperative organization of bacterial
1335 colonies: From Genotype to Morphotype. *Annual Reviews Microbiology*, 52, 779–806.
- 1336 Biggs, M.B., & Papin, J.A. (2013). Novel Multiscale Modeling Tool Applied to
1337 *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation. *PLoS ONE*, 8 (10). doi:
1338 10.1371/journal.pone.0078011.
- 1339 Bray, D., Levin, M.D., & Lipkow, K. (2007). The chemotactic behavior of computer-
1340 based surrogate bacteria. *Current Biology*, 17, 12–19. doi: 10.1016/j.cub.2006.11.027.
- 1341 Cooper, S., & Helmstetter, C.E. (1968). Chromosome replication and the division cycle
1342 of *Escherichia coli* B/r. *Journal of Molecular Biology*, 31, 519-540.
- 1343 Dens, E.D., Bernaerts, K., Standaert, A.R., & Van Impe, J.F. (2005a). Cell division
1344 theory and individual-based modeling of microbial lag. Part I. The theory of cell
1345 division. *International Journal of Food Microbiology*, 101, 303-318.
- 1346 Dens, E.D., Bernaerts, K., Standaert, A.R., Kreft, J.U., & Van Impe, J.F. (2005b). Cell
1347 division theory and individual-based modelling of microbial lag. Part II. Modeling lag
1348 phenomena induced by temperature shifts. *International Journal of Food Microbiology*,
1349 101, 319-332.
- 1350 Emonet, T., Macal, C.M., North, M.J., Wickersham, C.E., & Cluzel, P. (2005).
1351 AgentCell: a digital single-cell assay for bacterial chemotaxis. *Bioinformatics*, 21,
1352 2714–2721.
- 1353 Fujikawa, H., & Matsushita, M. (1989). Fractal Growth of *Bacillus subtilis* on Agar
1354 Plates. *Journal of the Physical Society of Japan*, 58, 3875-3878.
- 1355 Fujikawa, H., & Matsushita, M. (1991). Fractal Growth in the Concentration Field of
1356 Nutrient. *Journal of the Physical Society of Japan*, 60, 88-94.
- 1357 Ginovart, M., López, D., & Valls, J. (2002a). INDISIM, an individual-based discrete
1358 simulation model to study bacterial cultures. *Journal of Theoretical Biology*, 214 (2),
1359 305–19. doi:10.1006/jtbi.2001.2466.
- 1360 Ginovart, M., López, D., Valls, J., & Silbert, M. (2002b). Simulation modelling of
1361 bacterial growth in yoghurt. *International Journal of Food Microbiology*, 73, 415-425.
- 1362 Ginovart, M., López, D., Valls, J., & Silbert, M. (2002c). Individual based simulations
1363 of bacterial growth on agar plates. *Physica A*, 305, 604-618. pii: S0378-4371(01)00581-
1364 7.

1365 Ginovart, M., Blanco, M., Portell, X., & Ferrer-Closas, P. (2012). Modelización basada
 1366 en el individuo: una metodología atractiva para el estudio de biosistemas. Enseñanza de
 1367 las ciencias. Revista de investigación y experiencias didácticas, 30(2), 93-108.
 1368 Ginovart, M. (2015). ¿Qué pueden ofrecer los modelos basados en agentes vivos en el
 1369 contexto docente? Modelling in Science Education and Learning, 8(2). doi:
 1370 10.4995/msel.2015.3486.
 1371 Godin, M., Bryan, A.K., & Burg, T.P. (2007). Measuring the mass, density, and size of
 1372 particles and cells using a suspended microchannel resonator. Applied Physics Letters,
 1373 91.
 1374 Grijspeerdt, K., Kreft, J.U., & Messens, W. (2005). Individual-based modeling of
 1375 growth and migration of *Salmonella enteritidis* in hens' eggs. International Journal of
 1376 Food Microbiology, 100, 323–333. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.10.028.
 1377 Grimm, V. (1999). Ten years of individual-based modelling in ecology: what have we
 1378 learned and what could we learn in the future? Ecological Modelling, 115, 129–148.
 1379 doi: 10.1016/S0304-3800(98)00188-4.
 1380 Grimm, V., & Railsback, S.F. (2005). Individual-based modelling and ecology.
 1381 Princeton and Oxford: Princeton University Press.
 1382 Grimm, V., Berger, U., Bastiansen, F., Eliassen, S., Ginot, V., Giske, J., Goss-Custard,
 1383 J., Grand, T., Heinz, S.K., & Huse, G. (2006). A standard protocol for describing
 1384 individual-based and agent-based models. Ecological Modelling, 198, 115–126.
 1385 Grimm, V., Berger, U., de Angelis, D.L., Polhill, J.G., Giske, J., & Railsback, S.F.
 1386 (2010). The ODD protocol: A review and first update. Ecological Modelling, 221, 2760-
 1387 2768.
 1388 Hellweger, F.L., & Bucci, V. (2009). A bunch of tiny individuals: Individual-based
 1389 modelling for microbes. Ecological Modelling, 220, 8-22.
 1390 Kreft, J.U., Booth, G., & Wimpenny, J.W.T. (1998). BacSim, a simulator for individual-
 1391 based modelling of bacterial colony growth. Microbiology, 144, 3275-3287.
 1392 Kreft, J.U., Picioreanu, C., Wimpenny, J.W.T., & Van Loosdrecht, M.C.M. (2001).
 1393 Individual-based modelling of biofilms. Microbiology, 147, 2897–2912.
 1394 Lardon L.A., Merkey, B.V., Martins, S., Dötsch, A., Picioreanu, C., Kreft, J.U., &
 1395 Smets, B.F. (2011). iDynoMiCS: next generation individual-based modelling of
 1396 biofilms. Environmental Microbiology, 13, 2416–2434. doi:10.1111/j.1462-
 1397 2920.2011.02414.x.

1398 Maaløe, O., & Kjeldgaard, N.O. (1966). Control of Macromolecular Synthesis. W.A.
 1399 Benjamin, Nova York.
 1400 Mabrouk, N., Deffuant, G., Tolker Nielsen, T., & Lobry, C. (2010). Bacteria can form
 1401 interconnected micro- colonies when a self-excreted product reduces their surface
 1402 motility: evidence from individual- based model simulations. *Theorie in den*
 1403 *Biowissenschaften/Theory in Biosciences*, Springer Verlag, 129(1), 1-13.doi:
 1404 10.1007/s12064-009-0078-8.
 1405 Mabrouk, N., & Deffuant, G. (2011). A simple birth-death-migration individual-based
 1406 model for biofilm development. [en línea]: <hal-00605184>, [fecha de consulta: 1 junio
 1407 2016]. Disponible en <<https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00605184/document>>.
 1408 Matsushita, M., & Fujikawa, H. (1990). Diffusion-limited growth in bacterial colony
 1409 formation. *Physica A*, 168, 498-506.
 1410 Murray, J.D. (1990). *Mathematical biology*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
 1411 Rollins, N.D., Barton, C.M., Bergin, S., Janssen, M.A., & Lee, A. (2014). A
 1412 Computational Model Library for publishing model documentation and code.
 1413 *Environmental Modelling & Software*, 61, 59-64.
 1414 Olivera-Nappa, A., Picioreanu, C., & Asenjo, J.A. (2010). Non-homogeneous biofilm
 1415 modeling applied to bioleaching processes. *Biotechnology and bioengineering*, 106(4),
 1416 660-676.
 1417 Prats, C., Ferrer, J., López, D., Giró, A., & Vives-Rego, J. (2010). On the evolution of
 1418 cell size distribution during bacterial growth cycle: Experimental observations and
 1419 individual-based model simulations. *African Journal of Microbiology Research*, 4(5),
 1420 400-407.
 1421 Railsback, S.F., & Grimm, V. (2012). *Agent-Based and Individual-Based Modeling: A*
 1422 *Practical Introduction*. Princeton and Oxford: Princeton University Press.
 1423 Standaert, A.R., Poschet, F., Geeraerd, A.H., Uylbak, F.V., Kreft, J.U., & Van Impe,
 1424 J.F. (2005). A novel class of predictive microbial growth models: implementation in an
 1425 individual-based framework (1^a ed) *Computer applications in biotechnology 2004*, 183-
 1426 188, Reino Unido.
 1427 Tack, I.L.M.M., Logist, F., Fernández, E.N., & Van Impe, J.F.M. (2014). An
 1428 individual-based modelling approach to simulate the effects of cellular nutrient
 1429 competition on *Escherichia coli* K-12 MG1655 colony behavior and interactions in
 1430 aerobic structured food systems. *Food Microbiology*, 30, 1-10.

Verhulst, A.J., Cappuyns, A.M., Van Derlinden, E., Bernaerts, K., & Van Impe, J.F. (2011). Analysis of the lag phase to exponential growth transition by incorporating inoculum characteristics. *Food Microbiology*, 28, 656-666.

Wilensky, U. (1999). Netlogo. Evanston, IL: Center for Connected Learning and Computer-Based Modelling. Northwestern University. Retrieved from <http://ccl.northwestern.edu/netlogo/>.

Wilensky, U., & Rand, W. (2015). *An Introduction to Agent-Based Modeling: Modeling Natural, Social, and Engineered Complex Systems with NetLogo*. MIT Press.

ANEXO: Código de computación del simulador INDISIM-Plate-NL

```
globals [ area_col individuals-colony radius1-colony radius2-colony rq1 rq2
rq3 rq4 radius3-colony total-nutrient total-mass growing-ind starving-ind
inactive-ind OutPut_file time ]

turtles-own [ mass maintenance time-viability d00m repr_time repr_mass upt
ava_upt ]

patches-own [ nutrient num_microorg ]

to setup
  clear-all
  set area_col 0
  setup-microorgs
  ask patches [ set nutrient ( abs(random-normal initial-nutrient (0.05 *
initial-nutrient)) )    color-nutrient ]
  set area_col count patches with [ any? turtles-here ]
  set individuals-colony count turtles
  set growing-ind 0    set starving-ind 0    set inactive-ind 0
  set total-nutrient sum [ nutrient ] of patches
  set total-mass sum [ mass ] of turtles
  set radius1-colony 0    set radius2-colony 0    set radius3-colony 0
  setup-output
  reset-ticks
  write-outputfile
end

to setup-microorgs
  set-default-shape turtles "circle"
  create-turtles initial-microorgs
```

```

1472         [ setxy 0 0 set color lime set maintenance 0 set mass abs (
1473 random-normal 2880 (0.10 * 2880)) set repr_time 0 set time-viability max-
1474 time-viability ]
1475 end
1476
1477 to setup-output
1478     if (file-exists? "INDISIM-plate-NL_Output.csv") [ carefully [ file-delete
1479 "INDISIM-plate-NL_Output.csv" ][ print error-message ] ]
1480     file-open "INDISIM-plate-NL_Output.csv"
1481     file-type "Time_(min) " file-type "Microorganisms " file-type "Growing "
1482 file-type "Starving " file-type "Inactive "
1483     file-type "Nutrient " file-type "Mass " file-type "Radius1-colony " file-
1484 type "Radius2-colony " file-type "Radius3-colony " file-type "Area-colony "
1485 file-print " "
1486     file-close
1487 end
1488
1489 to write-outputfile
1490     file-open "INDISIM-plate-NL_Output.csv"
1491     file-type ticks
1492     file-type " " file-type individuals-colony file-type " " file-type
1493 growing-ind file-type " " file-type starving-ind file-type " " file-type
1494 inactive-ind
1495     file-type " " file-type total-nutrient file-type " " file-type total-mass
1496     file-type " " file-type radius1-colony file-type " " file-type radius2-
1497 colony file-type " " file-type radius3-colony file-type " " file-type
1498 area_col
1499     file-type " " file-print " "
1500     file-close
1501 end
1502
1503 to go
1504     set area_col 0 set individuals-colony count turtles
1505     set growing-ind count turtles with [ color = lime ] set starving-ind count
1506 turtles with [ color = orange ] set inactive-ind count turtles with [ color =
1507 red - 1 ]
1508     set total-nutrient sum [nutrient] of patches set total-mass sum [mass] of
1509 turtles
1510     if count turtles > 500000 [file-close stop] if sum [nutrient] of patches <
1511 0.1 [file-close stop] if ticks > 100000 [file-close stop]
1512     ask turtles [ eat mantain reproduce
1513         ifelse time-viability < 0.75 * max-time-viability [ set color orange ] [
1514 set color lime ]
1515         if time-viability < 1 [ set color red - 1 ] ]
1516     ask patches [ color-nutrient count-turtles]
1517     set area_col count patches with [ any? turtles-here ]

```

```

1518     diffuse nutrient diffusion-coefficient
1519     ask turtles [ setxy pxcor pycor set d00m distancexy 0 0 ]
1520     set radius1-colony max [d00m] of turtles    set radius2-colony sqrt (
1521 area_col / 3.1416 )
1522     ifelse (any? turtles with [ xcor >= 0 and ycor >= 0 ]) [ set rq1 (max [d00m]
1523 of turtles with [ xcor >= 0 and ycor >= 0 ]) ] [ set rq1 0 ]
1524     ifelse (any? turtles with [ xcor <= 0 and ycor >= 0 ]) [ set rq2 (max [d00m]
1525 of turtles with [ xcor <= 0 and ycor >= 0 ]) ] [ set rq2 0 ]
1526     ifelse (any? turtles with [ xcor <= 0 and ycor <= 0 ]) [ set rq3 (max [d00m]
1527 of turtles with [ xcor <= 0 and ycor <= 0 ]) ] [ set rq3 0 ]
1528     ifelse (any? turtles with [ xcor >= 0 and ycor <= 0 ]) [ set rq4 (max [d00m]
1529 of turtles with [ xcor >= 0 and ycor <= 0 ]) ] [ set rq4 0 ]
1530     set radius3-colony (rq1 + rq2 + rq3 + rq4 ) / 4
1531     write-outputfile
1532     tick
1533 end
1534
1535 to eat
1536     if color != red - 1 [ let i random-normal 0 0.10    set upt ((0.0088 * (1 +
1537 i) * 0.26 * nutrient * mass ) / (0.45 * (0.00539 + nutrient)))
1538             set ava_upt (0.5 * nutrient)    if upt > ava_upt [ set
1539 upt ava_upt ]    set nutrient nutrient - upt ]
1540 end
1541
1542 to mantain
1543     if color != red - 1 [ set maintenance (upt - (0.00099 * 0.26 * mass))
1544             ifelse maintenance > 0 [ set mass mass + (maintenance * 0.45 * (1 /
1545 0.26))    set time-viability time-viability + 1 ]
1546             [ if mass > (0.25 * 2880)    [ if mass - ((-
1547 maintenance) * 0.45 * (1 / 0.26)) > 0
1548             [ set mass mass - ((- maintenance) * 0.45 * (1 /
1549 0.26))    set time-viability time-viability - 1 ] ] ]
1550     set maintenance 0
1551     if time-viability >= max-time-viability [ set time-viability max-time-
1552 viability ] ]
1553 end
1554
1555 to reproduce
1556     if color != red - 1
1557     [ if mass > 2880    [ set repr_time repr_time + 1    if repr_time > abs
1558 (random-normal 60 (0.1 * 60))
1559             [ set repr_mass mass * abs (random-normal 0.5 (0.1 * 0.5) )    set mass
1560 mass - repr_mass    set repr_time 0    hatch 1 [ newborn-spot ] ] ] ]
1561 end
1562
1563 to newborn-spot

```

```

1564     let i 0 set color lime set mass repr_mass set repr_time 0 move-to one-of
1565 neighbors
1566     ifelse not any? other turtles-here [ setxy pxcor pycor set d00m distancexy 0
1567 0 ] [ set i i + 1 if i < 10 [ newborn-spot] ]
1568 end
1569
1570 to count-turtles
1571     ifelse any? turtles-here [ set num_microorg ( count turtles-here) ] [ set
1572 num_microorg 0 ]
1573 end
1574
1575 to color-nutrient
1576     set pcolor scale-color yellow nutrient 0 (2 * initial-nutrient)
1577 end
1578

```

```

Crecimiento de colonias bacterianas Artículo MSEL 2016 ParaCapturas - NetLogo [E:\Desktop\ESCRITORIA\TFG Meribell Font Marques 2015\Article MSEL 2016]
File Edit Tools Zoom Tabs Help
Interface Info Code
Find... Check Procedures + Indent automatically

globals [ area_col individuals-colony radius1-colony radius2-colony rql rq2 rq3 rq4
radius3-colony total-nutrient total-mass growing-ind starving-ind inactive-ind outPut_file time ]

turtles-own [ mass maintenance time-viability d00m repr_time repr_mass upt ava_upt ]

patches-own [ nutrient num_microorg ]

to setup
  clear-all
  set area_col 0
  setup-microorgs
  ask patches [ set nutrient ( abs(random-normal initial-nutrient (0.05 * initial-nutrient))) color-nutrient ]
  set area_col count patches with [ any? turtles-here ]
  set individuals-colony count turtles
  set growing-ind 0 set starving-ind 0 set inactive-ind 0
  set total-nutrient sum [ nutrient ] of patches
  set total-mass sum [ mass ] of turtles
  set radius1-colony 0 set radius2-colony 0 set radius3-colony 0
  setup-output
  reset-ticks
  write-outputfile
end

to setup-microorgs
  set-default-shape turtles "circle"
  create-turtles [ setxy 0 0 set color lime set maintenance 0 set mass abs ( random-normal 2880 (0.10 * 2880)) set repr_time 0 set time-viability max-time-viability ]
end

to setup-output
  if (file-exists? "INDISIM-plate-NL_Output.csv") [ carefully [file-delete "INDISIM-plate-NL_Output.csv"] [ print error-message ] ]
  file-open "INDISIM-plate-NL_Output.csv"
  file-type "Time (min)" file-type "Microorganisms" file-type "Growing" file-type "Starving" file-type "Inactive"
  file-type "Nutrient" file-type "Mass" file-type "Radius1-colony" file-type "Radius2-colony" file-type "Radius3-colony" file-type "Area-colony" file-print " "
  file-close
end

to write-outputfile
  file-open "INDISIM-plate-NL_Output.csv"
  file-type ticks
  file-type " " file-type individuals-colony file-type " " file-type growing-ind file-type " " file-type starving-ind file-type " " file-type inactive-ind
  file-type " " file-type total-nutrient file-type " " file-type total-mass
  file-type " " file-type radius1-colony file-type " " file-type radius2-colony file-type " " file-type radius3-colony file-type " " file-type area_col
  file-type " " file-print " "
  file-close
end

to go
  set area_col 0 set individuals-colony count turtles
  set growing-ind count turtles with [ color = lime ] set starving-ind count turtles with [ color = orange ] set inactive-ind count turtles with [ color = red - 1 ]
  set total-nutrient sum [ nutrient ] of patches set total-mass sum [ mass ] of turtles
  if count turtles > 500000 [file-close stop] if sum [ nutrient ] of patches < 0.1 [file-close stop] if ticks > 100000 [file-close stop]
  ask turtles [ eat maintain reproduce
    ifelse time-viability < 0.75 * max-time-viability [ set color orange ] [ set color lime ]
    if time-viability < 1 [ set color red - 1 ] ]
  ask patches [ color-nutrient count-turtles ]
  set area_col count patches with [ any? turtles-here ]
  diffuse nutrient diffusion-coefficient
  ask turtles [ setxy pxcor pycor set d00m distancexy 0 0 ]
  set radius1-colony max [ d00m ] of turtles set radius2-colony sqrt ( area_col / 3.1416 )
  ifelse (any? turtles with [ xcor >= 0 and ycor >= 0 ]) [ set rql (max [d00m] of turtles with [ xcor >= 0 and ycor >= 0 ]) ] [ set rql 0 ]
  ifelse (any? turtles with [ xcor <= 0 and ycor >= 0 ]) [ set rq2 (max [d00m] of turtles with [ xcor <= 0 and ycor >= 0 ]) ] [ set rq2 0 ]
  ifelse (any? turtles with [ xcor <= 0 and ycor <= 0 ]) [ set rq3 (max [d00m] of turtles with [ xcor <= 0 and ycor <= 0 ]) ] [ set rq3 0 ]
  ifelse (any? turtles with [ xcor >= 0 and ycor <= 0 ]) [ set rq4 (max [d00m] of turtles with [ xcor >= 0 and ycor <= 0 ]) ] [ set rq4 0 ]
  set radius3-colony (rql + rq2 + rq3 + rq4) / 4
  write-outputfile
  tick
end

to eat
  if color != red - 1 [ let i random-normal 0 0.10 set upt ((0.0088 * (1 + i) * 0.26 * nutrient * mass) / (0.45 * (0.00539 + nutrient)))
  set ava_upt (0.5 * nutrient) if upt > ava_upt [ set upt ava_upt ] set nutrient nutrient - upt ]
end

to maintain
  if color != red - 1 [ set maintenance (upt - (0.0099 * 0.26 * mass))
  ifelse maintenance > 0 [ set mass mass + (maintenance * 0.45 * (1 / 0.26)) set time-viability time-viability + 1 ]
  [ if mass > (0.25 * 2880) [ if mass < ((- maintenance) * 0.45 * (1 / 0.26)) > 0
  [ set mass mass - ((- maintenance) * 0.45 * (1 / 0.26)) set time-viability time-viability - 1 ] ] ]
  set maintenance 0
  if time-viability >= max-time-viability [ set time-viability max-time-viability ] ]
end

to reproduce
  if color != red - 1
  [ if mass > 2880 [ set repr_time repr_time + 1 if repr_time > abs (random-normal 60 (0.1 * 60))
  [ set repr_mass mass * abs (random-normal 0.5 (0.1 * 0.5)) set mass mass - repr_mass set repr_time 0 hatch 1 [ newborn-spot] ] ] ]
end

to newborn-spot
  let i 0 set color lime set mass repr_mass set repr_time 0 move-to one-of neighbors
  ifelse not any? other turtles-here [ setxy pxcor pycor set d00m distancexy 0 0 ] [ set i i + 1 if i < 10 [ newborn-spot] ]
end

to count-turtles
  ifelse any? turtles-here [ set num_microorg ( count turtles-here) ] [ set num_microorg 0 ]
end

to color-nutrient
  set pcolor scale-color yellow nutrient 0 (2 * initial-nutrient)
end

```

1579